

Université de Québec
Institut National de la recherche Scientifique
Centre Eau Terre Environnement

**Procédés de fortification, de floculation et de formulation dans la production de
biopesticide à partir des eaux usées d'industrie d'amidon à base de *Bacillus*
*Thuringiensis var. kurstaki***

Par :

Adama Ndao

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Ph.D. en sciences de l'eau**

Examineur externe

Richard Trudel
Consultant en entomologie

Examineur externe

Hubert Cabana
Université de Sherbrooke

Examineur interne

Patrick Drogui
INRS-ETE

Directeur de recherche

Rajeshwar Dayal Tyagi
INRS-ETE

Co-directeur de recherche

Jose Valero
INRS-ETE

© Droits réservés de Adama Ndao, 2018

Remerciements

Je tiens à adresser toute ma gratitude et reconnaissance au Pr. Tyagi. En, 2012 j'ai eu l'opportunité d'intégrer son groupe de recherche en bioprocédés pour une maîtrise de deux années suivies d'un doctorat en sciences de l'eau et de l'environnement. Auprès de lui, j'ai non seulement eu l'opportunité unique de travailler dans un domaine qui rencontre ma passion. J'ai surtout bénéficié des conseils, de la rigueur, de l'observation, du sens critique et de l'expérience d'un scientifique de talent. Pour toutes ces raisons, je vous adresse le plus sincère des remerciements.

Je voudrais également remercier le Dr Jose Valère. Souvent, vos remarques pertinentes, les réponses détaillées que vous avez procurées à certaines de mes questions ont aiguillé l'interprétation de certains résultats obtenus. J'aimerais souligner également la sympathie que vous manifestez auprès de toutes les personnes qui vous côtoient. Merci.

Un mot de remerciement au personnel du laboratoire de biotechnologies environnementales. Au Dr. Mathieu Drouin et à Sylvain Perrier, merci pour votre disponibilité, vos conseils et toute votre bonne volonté, lors des séances de fermentation, de centrifugation en continu et de formulation.

Également, je suis particulièrement reconnaissant de l'intérêt qu'ont fait montre, Messieurs les professeurs Hubert Cabana, Patrick Drogui et Monsieur Richard Trudel en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à souligner la contribution de Sravan Yellapu, Rajwinder Kaur et tous les autres membres de l'équipe du Pr Tyagi. Les séances de présentation de vendredi m'auront permis d'acquérir des connaissances inestimables.

Une pensée à tout le personnel de l'INRS : Stéphane Premont, Linda Aubert, Stéphane Moise etc. Pour votre aide, votre soutien et votre expertise.

J'aimerais saluer des amis rencontrés au cours de ce cheminement : Khalid Oubennaceur, Anas, Rachid, Jean Robert, merci pour votre amitié inestimable.

J'aimerais finir par le commencement. A la famille, mon cher papa, maman, mes frères et sœur. Vous êtes le socle sur lequel je me repose. Votre présence, votre amour inconditionnel, votre appui sans faille demeurent ma fierté et mon carburant. Merci.

Synthèse

Résumé

Ce projet de recherche vise à développer un biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis var kurstaki*, Btk, efficace contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette et compétitif vis-à-vis des biopesticides commerciaux. Ce projet est né dans un contexte de lutte contre cette tortricidae qui est un des ravageurs le plus destructeur des forêts du Québec et en Amérique du Nord en général. Cet insecte endémique provoque une épidémie environ tous les 30 ans, chacune durant en moyenne 20 ans, ce qui affecte grandement l'industrie forestière, qui est très importante dans l'activité économique de la province.

Le coût de la matière première pour l'obtention de biopesticide à base de Btk représente jusqu'à 40% du coût global de production. En effet, ces coûts qui sont inhérents au biopesticide à base de substrat semi-synthétique réduisent son accessibilité. Afin de s'affranchir de cette contrainte, la production de biopesticide à base de *Btk*, grâce à des matières alternatives suscite beaucoup d'intérêt. L'usage de substrats alternatifs tels que les eaux usées d'industries d'amidon ou des boues secondaires issues du traitement des résidus agroalimentaires permettrait de réduire le coût sur l'obtention du biopesticide ainsi que la valorisation de résidus qui posent un problème de traitement et de leur élimination finale dans l'environnement. Ces matières contiennent une forte concentration de la demande chimique en oxygène (DCO), sous la forme de carbone et de sources d'azote (amidon, gluten, protéines, fibres et autres minéraux).

La production du biopesticide est caractérisée par la production de Btk à partir d'un substrat dans un bioréacteur, suivie d'une étape de centrifugation pour concentrer les matières actives de ce bacille (cellules totales, spores viables, delta endotoxine, autres facteurs de virulence synthétisés par Btk) et enfin, la formulation qui conditionne le biopesticide à résister aux facteurs externes (rayons ultra-violet, précipitation, agents antibiotiques) ; Le pouvoir larvicide ou entomotoxicité du biopesticide dépendant de chacune de ces étapes.

Le premier objectif de cette recherche porte sur la caractérisation et le développement de nouveaux substrats pour la culture optimale de Btk. Dans cette optique, les eaux usées d'industrie d'amidon ont servi comme substrats de culture de base pour la culture de ce microorganisme. Afin d'enrichir le substrat en matières actives de cet insecticide biologique,

pour élever son potentiel entomotoxique, celui-ci a été enrichi en milieux semi-synthétiques, en acide aminé et en boues secondaires issues du traitement en anaérobie et en aérobie des eaux usées d'industrie d'amidon.

Un autre objectif porte sur l'optimisation de la concentration des matières actives de Btk dans le culot issu de la centrifugation du bouillon fermenté. L'ajout d'agent coagulant-floculant durant la centrifugation permet de réduire les pertes de cellules totales, de spores viables et de delta-endotoxine dans le surnageant du bouillon fermenté centrifugé. Egalement, l'enrichissement du bouillon fermenté de matières actives de Btk par optimisation du substrat permet de réduire le nombre de centrifugations requises pour la formulation du biopesticide.

L'étude sur la formulation du biopesticide à base de Btk en fonction des nouveaux substrats étudiés constitue le dernier objectif de ce projet. Les tests portant sur l'adhésivité, et la persistance du biopesticide sur les branches des sapins baumiers ont été réalisés. L'entomotoxicité, la viscosité et la taille des particules des différentes formulations développées ont également été comparées aux formulations commerciales.

L'étude des substrats pour la culture de Btk montre que le SIW (eaux usées d'industries d'amidon) est un milieu pauvre en carbone et en azote organique. L'enrichissement de celui-ci par du milieu soja à 25% entraîne une synthèse importante d'endotoxine (1200 µg/ml), du compte des spores viables ($1,35 \times 10^9$ CFU/mL), du compte des cellules totales ($1,65 \times 10^9$ CFU/mL) et de l'entomotoxicité (30 737 unité internationale/µL ou UI/µL) comparativement au milieu SIW contrôle (sans ajout de supplément) et à la préparation commerciale, Foray 76B. Ces derniers ont des pouvoirs entomotoxiques respectifs de 17 068 UI/ µL (SIW contrôle) et 20 000 UI/ µL (Foray 76B). Alors que les milieux extrait de malt contrôle, farine de maïs contrôle entraînent une faible croissance cellulaire. En outre, lorsque, les boues aérobies et anaérobies (provenant du traitement des eaux usées d'industrie d'amidon) et le SIW sont stérilisés à pH 2 et fortifiés à 30g/L dans le substrat SIW, les résultats d'entomotoxicité des formulations respectives, 20 000 UI/ µL, 20 500 UI/ µL, 22 500 UI/ µL, obtenus étaient comparables à celle du Foray 76B. Toutefois, ces pouvoirs larvicides étaient inférieurs à ceux obtenus avec la formulation SIW fortifié de soja. Par ailleurs, lorsque le milieu SIW est supplémenté d'acide glutamique, de glutamate et d'acide aspartique optimisé à 0,33g/L, la synthèse de delta endotoxine augmente significativement à 602 µg/ml comparativement au milieu SIW sans acides aminés ajoutés (519 µg/ml).

Le supplément du SIW par du milieu soja 25% a permis de concentrer le bouillon fermenté en matières actives de Btk. Cette concentration conduisant à obtenir un potentiel entomotoxique (21367 UI μ L) équivalent à 30 MIU/ha (Milliards D'Unités Internationales) après une concentration du bouillon fermenté par 2 fois. Ces résultats ont ainsi permis d'augmenter la productivité du procédé. Pour une entomotoxicité similaire (30 MUI/ha), un volume de 22L de formulation a été produit à partir de 100L de bouillon fermenté fortifié de soja 25%, alors que le bouillon fermenté issu du substrat de SIW traité à pH 2 et concentrée 10 fois par centrifugation a permis de produire un volume de 11L de formulation.

Les résultats de floculation du bouillon fermenté après 48h de fermentation de Btk à partir du SIW montrent une activité de floculation importante à pH 5 pour une concentration de 150mg/L de chitosane et 500mg/L d'acide tannique. Cette activité de floculation se traduit par un abattement important des cellules totales (de 3.10×10^5 à 2.5×10^3 CFU/mL), des spores viables (de 3×10^5 à 2.1×10^3 CFU/mL) dans le surnageant du bouillon fermenté. Cette activité de floculation s'est également mesurée par un abattement des endotoxines dans le culot passant de 440 à 480 μ g/mL. Lorsque le procédé de floculation avait lieu avant que le bouillon issu de la fermentation de Btk, soit soumis à une centrifugation, les floccs formés par le chitosane et l'acide tannique résistaient à une centrifugation (15 000 rpm) importante comparativement au contrôle. L'entomotoxicité de la formulation comportant le chitosane et l'acide tannique est de 21 000 UI μ L comparativement au contrôle de 17 000 UI μ L. L'abattement des matières actives de Btk par les flocculants permet d'élever le potentiel entomotoxique de la préparation. De plus, l'acide tannique joue un rôle synergique dans l'entomotoxicité. En effet, des observations histopathologiques montrent que l'épithélium de l'intestin moyen des larves de diptère et de lépidoptère est affecté par l'acide tannique.

L'optimisation de la viscosité, du lessivage, de la dispersion et de la demi-vie de l'entomotoxicité ($T_{X0.5}$) des formulations étudiées (SIW, SIW fortifié de soja à 25%) a été optimisée en variant les paramètres des adjuvants (carboxyméthylcellulose, xantham ghum, sorbitol et la mélasse) qui ont un effet direct sur ces paramètres. Ces différentes suspensions ont été comparées à la formulation commerciale Foray 76B. Les résultats de demi-vie portant sur l'entomotoxicité ($T_{X0.5}$) des formulations étaient de 10 jours pour la formulation SIW, 12.5 jours pour la formulation SIW fortifié de soja à 25% et de 7 jours pour la formulation Foray 76B. Alors que, la viscosité optimale mesurée pour la formulation SIW était de 185 mPas, 137 mPas pour la formulation SIW fortifié de soja à 25% et 135 mPas pour Foray 76B. En outre, lorsque les

formulations subissaient un test de lessivage, la formulation SIW fortifié de soja et la formulation SIW conservait de moitié le nombre de cellules totales/mL après une semaine de pulvérisation sur des branches de sapin baumier. Enfin, les tests de dispersion des matières en suspension des formulations montrent respectivement une suspension de 95% pour la formulation SIW, 96% pour la formulation SIW fortifié de soja et 98% pour Foray 76B.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	2
Synthèse	3
Résumé	3
1. Revue de littérature	17
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
1.1.1 Distribution de Bt	17
1.1.2 Formation des spores (sporulation)	18
1.1.3 Rôle des spores et de leur paroi sur les insectes nuisibles	19
1.1.4 Mode d'action de l'endotoxine Cry1A contre les lépidoptères	19
1.1.5 Protéases de Bt	21
1.2 Cycle de vie de la tordeuse et techniques de répression	22
1.2.1 Dégâts	23
1.3 Paramètres de fermentation	24
1.3.1 La composition du milieu de culture	24
1.3.2 Température et pH de fermentation	25
1.3.3 Optimisation de l'inoculum	25
1.3.4 Transfert d'oxygène	26
1.3.5 Agitation du milieu	27
1.4. Techniques de formulation	30
1.4.1 Récolte - Centrifugation et autres	30
1.4.2. Principe de coagulation et floculation	30
1.4.3 Structure des colloïdes	31
1.4.4 Les coagulants et les flocculants chimiques	32
1.4.5 Les coagulants de type sels métalliques	33
1.4.6 Les flocculants de type polymères (polyélectrolytes)	34
1.4.7 Les coagulants d'origine naturelle	34
1.4.7.1 Les polymères d'origine biologique	34
1.4.7.2 Le chitosane	35

1.4.7.3 Acide tannique	37
1.5 DIFFERENTS TYPES DE FORMULATION	38
1.5.1. Différents types de formulation	38
1.5.1.1. Les formulations solides	38
1.5.1.2. Les formulations liquides.....	39
1.6. Effets environnementaux.....	40
1.6.1. Pluie.....	41
1.6.2. Température	41
1.6.3. Impacts des feuillages	42
1.6.4. Effets liés à l'applicabilité des biopesticides sur le terrain	42
1.6.4.1. Suspension et dispersion	43
1.6.4.2. Préservation contre les contaminations.....	43
1.6.4.3. Phagostimulation	44
1.6.5. Les additifs de formulation.....	44
2. Problématique	46
3. Hypothèses.....	47
4. Objectif de recherche principal.....	48
5. Originalité de la recherche	49
6. Démarche méthodologique	51
6.1. Souche de culture	51
6.2. Différents substrats de culture pour la fermentation de Btk.....	51
6.2.1. Eaux usées d'industrie d'amidon	51
6.2.2. Milieu Soja	53
6.2.3. Extrait de malt.....	54
6.2.4. Farine de maïs.....	55
6.2.5. Boues anaérobies et aérobies secondaires	56
6.2.6. Acides aminés	57
6.3. Fermentation.....	58
6.3.1. Eaux usées d'industries d'amidon (SIW), milieux semi-synthétiques.....	58
6.3.1.1. Inoculum	58
6.3.1.2. Fermentation en bioréacteur.....	58

6.3.2. Boues aérobies et anaérobies.....	59
6.3.2.1. Fermentation en bioréacteur de 5L	59
6.3.2.2. Traitement à différents pH du SIW, des boues aérobies et anaérobies secondaires	59
6.3.2.3. Fortification à différentes concentrations des milieux boues aérobies, anaérobies et SIW dans le milieu SIW.....	61
6.4. Flocculation	61
6.4.1. Taille des particules.....	62
6.4.2. Potentiel zêta.....	63
6.4.3. Turbidité	64
6.5. Cellules totales et spores viables.....	64
6.6. Endotoxine	64
6.7. Activité protéolytique	65
6.8. Formulation	65
6.8.1. Centrifugation en continu	67
6.8.2. Entomotoxicité.....	68
6.8.3. Dispersion	69
6.8.4. Lessivage.....	70
6.8.5. Test radiation ultraviolet.....	71
6.8.6. Viscosité.....	71
7.1. Effet des milieux semi-synthétiques supplémentés au SIW sur la croissance, la sporulation, la synthèse d'endotoxine de Btk et l'entomotoxicité du biopesticide.....	72
7.2. Fortification du substrat SIW par les substrats boues anaérobies, aérobies et SIW	75
7.3. Techniques de flocculation avec le chitosane et l'acide tannique (CH-TA)	77
Figure 10 : Effets du chitosane et du chitosane-tannique acide associé à la centrifugation sur les cellules totales et les spores viables de Btk à pH 5	79
7.4. Demi-vie, dispersion et lessivage de la formulation à base de SIW et SIW fortifié de soja à 25% .	79
8. Conclusions	83
9. Principales recommandations	84
Références	85
Starch industry wastewater fortification using sludge from aerobic and anaerobic treatment of starch sewage treatment.....	122
Abstract	136

Introduction	137
Materials and methods	138
Btk strain	138
Growth Medium	138
SIW	138
Anaerobic (AnS) and aerobic (AeS) sludge	138
Fermentation	139
SIW, Aes and Ans pre-treatment at different pH	139
SIW media fortified with Aes, Ans and SIW medium at different concentrations	140
Total cells and viable spore count	140
Endotoxin estimation	141
Zeta potential	141
Viscosity	141
Particle size	142
Entomotixicity bioassay	142
Fortification impact on particle size and fermented broth viscosity	143
Formulation	143
Results and discussion	144
Btk total cell growth, viable spores and endotoxin synthesis in Aes, Ans and SIW media	144
SIW Fortification by Ans, Aes and SIW	145
Particle size, viscosity and zeta potential in different substrates	147
Entomotixicity bioassay	148
Conclusion	148
Recovery of Btk cells, spores, and toxin with the aid of coagulants and flocculants.....	158
Introduction	172
Materials and methods	174
Bacterial strain	174
Experimental procedure	174
Total cell count and viable spore count	176
Endotoxin estimation	177
Protease activity	177

Entomotixicity bioassay	178
Physical parameters	178
Particle size.....	178
Zeta potential	179
Turbidity.....	179
Formulation.....	179
Results and discussion	180
Treatment of the fermented broth with Chitosan at different pH (Neutral and acidic pH).....	180
Impact of chitosan and tannic acid at neutral and acidic pH 5	182
Entomotoxity.....	184
Conclusion	184
Biopesticide optimization and formulation processes based on starch industrial wastewater fortified with soybean medium.....	197
Abstract	211
Introduction	212
Materials and methods	213
Btk strain	213
Growth media	213
Inoculum	213
Fermentation process.....	214
SIW fermentation (2000 L fermenter)	214
Fermentation for SIW fortified with soybean medium (150 L fermenter)	215
Total cell and viable spore count.....	216
Endotoxin concentration.....	216
Batch and continuous centrifugation	217
Biopesticide formulation.....	218
Particle size.....	218
Viscosity	219
U.V radiation	219
Rainfastness	220
Suspending Agent.....	220

Zeta potential	221
Entomotixicity	221
Results.....	222
Btk fermentation using SIW or SIW fortified with soybean medium	222
Formulation.....	224
Fermented broth/cream optimization.....	224
pH and preservation against contamination.....	225
Viscosity	225
Entomotixicity	226
U.V half life.....	228
Suspending agent	228
Rainsfatness	229
Conclusion	230
Reference	231

Liste des figures

Synthèses

Figure 1: Mécanisme de la toxicité des protéines Cry de Bt (modifié à partir de Whalon et Wingerd, 2003).	20
Figure 2: Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995).	26
Figure 3 : Distribution des bulles d'air en fonction de l'agitation et du flux d'air (Doran, 1995).	28
Figure 4: Potentiel Zêta	32
Figure 5 - Structure chimique de la cellulose, de la chitine et du chitosane (Ravi Kumar, 2000)	35
Figure 6 : Structure de l'acide tannique	38
Starch industry wastewater fortification using sludge from aerobic and anaerobic treatment of starch sewage treatment	
Figure 1: Btk growth profile employing aerobically digested sludge, anaerobically digested sludge and SIW: a) total cell count b) viable spores count	162
Figure 2: Btk endotoxin synthesis profile employing anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW.	163
Figure 3: Btk growth profile from anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2: a) total cells count b) viable spores count.....	164
Figure 4: Btk endotoxin synthesis profile employing anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2	165
Figure 5: Btk growth profile employing SIW fortified with 15g/L of anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2 a) total cells b) viable Btk spores.....	166
Figure 6: Btk endotoxin synthesis profile using pre-treated SIW and fortified with 15g/L of anaerobically digested sludge or aerobically digested sludge.	167
Figure 7: Btk growth profile using pre-treaed SIW at pH 2 and fortified with 30g/L of anaerobically digested sludge or aerobically digested sludge and SIW a) total cells b) viable spores.	168
Figure 8: Btk endotoxin synthesis profile employing pre-treated SIW at pH 2 and fortified with 30g/Lof anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW	169
Figure 9: Zeta potential (mV) and colloid stability	170

Recovery of Btk cells, spores, and toxin with the aid of coagulants and flocculants

Figure 1: Mass balance of biopesticide production process around centrifuge using SIW (control) as growth medium: biomass and endotoxin losses in supernatant.204

Figure 2: Variation of turbidity (NTU) and zeta potential (mV) in SIW fermented broth supernatant employing different dose of chitosan for flocculation at pH 5 and 7205

Figure 3: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant, (B) endotoxins concentration in pellet, determination at pH 5 and 7 after chitosan flocculation (SIW fermented broth).206

Figure 4: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after chitosan flocculation and centrifugation at pH 5 (SIW fermented broth).207

Figure 5: Variation of turbidity in supernatant and zeta potential after chitosan (CH) and tannic acid (TA) flocculation at pH 5 and pH 7.....208

Figure 6: (A) Total cells count, viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after flocculation with chitosan and tannic acid at pH 5 and 7 (SIW fermentation broth).....209

Figure 7: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after flocculation (chitosan-tannic acid) at pH 5 followed by centrifugation (SIW fermentation broth).....210

Liste des tableaux

Synthèses

Tableau 1: Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée	28
Tableau 2: Ordres de grandeurs de diamètre des particules.....	31
Tableau 3: Fonctions et effets de quelques adjuvants de formulation	45
Tableau 4 : Caractéristiques SIW - Longueur d'onde suggérée et limite de détection estimée pour les minéraux sélectionnés par ICP-AES axial Vista.....	52
Tableau 5: Composition du milieu Soja.....	53
Tableau 6 : Composition du milieu extrait de malt	54
Tableau 7 : Composition du milieu amidon de maïs	55
Tableau 8: Caractéristiques physiques et chimiques des substrats.....	56
Tableau 9: Détermination des glucides par LC-MS-MS après traitement des substrats à différent pH.....	60
Tableau 10 : Concentration de différents adjuvants, viscosité, taille des particules, cellules totales, spores viables, endotoxine présentes dans les Formulations SIW, SIW fortifié de soja, F2d, Foray 76B et Btk sander's.....	65
Table 1 : SIW characteristics - Suggested wavelength and estimated detection limit for minerals selected by ICP-AES axial Vista	152
Table 2: Physical and chemical characteristics of substrates.....	154
Table 3: Carbohydrate determination by LC-MS-MS after substrate pre-treatment at different pH values.....	155
Table 4: Physical parameters of the different substrates studied before fermentation...	156
Table 5: Formulation composition for 100L volume.....	159
Table 6: Entomotoxicity of different formulation prepared from fermented broths of different substrates.....	160
Table 3: Formulation composition for a 100 L volume	193
Table 4: Floc size, particle size, proteases activity and turbidity after addition of chitosan to fermented broth at different pH (SIW fermented broth)	194
Table 10: Entomotoxicity of different formulations prepared from different fermented broth and with addition of flocculants and further centrifuged (batch centrifuge) compared to control.	203

Introduction générale sur la synthèse

La tordeuse des bourgeons d'épinette est un insecte ravageur et endémique des forêts de l'Amérique du Nord. Son cycle biologique comporte une génération par année. Après éclosion à la fin de l'automne suivie d'une incubation durant l'hiver, la chenille de 3^e âge s'attaque aux feuillages et aux jeunes bourgeons des sapins baumiers ainsi que des épinettes au début du printemps. Cette population de chenille provoque une épidémie à tous les 30 ans. Vu l'importance du secteur forestier au niveau de l'économie locale et la résurgence de la population de chenilles, années après années, la lutte contre ce fléau demeure cruciale (Blais 1983, Sanders 1991). Face à cette problématique, l'usage des produits phytosanitaires comme moyen de prévention et de contrôle a été systémique pendant des décennies dans les forêts canadiennes. Toutefois, l'utilisation intempestive des pesticides chimiques a mené à la sélection de souches d'insectes nuisibles agricoles ou vecteurs de maladies humaines et à la pollution des cours d'eaux, des nappes phréatiques et des récoltes (Tanaka Yoshitake and Satoshi Omura, 1993). En effet, environ trois millions de tonnes de pesticides chimiques (20 milliards de dollars par an) sont vendus partout dans le monde. Seulement 500 millions de dollars de ce montant est attribué au pesticide biologique et plus de 60% des 500 millions est lié aux produits commerciaux de *Bacillus Thuringiensis* (Bt) (Hajeck et al. 2004 ; Hynes and Susan, 2006). Cette situation s'explique par le coût toujours élevé pour la production de biopesticide tel que les formulations à base de Bt (Hynes and Susan, 2006). Le coût de la matière première pour la production de biopesticide à base de Bt représente jusqu'à 40% du coût global de production, (Linsanky et al., 1993 ; Devidas Patil et al. 2014). Il est donc essentiel de trouver des substrats alternatifs, pour la production à des coûts compétitifs des biopesticides à base de Bt.

Dans cette perspective, la bioconversion des eaux usées d'industrie agroalimentaire et des boues secondaires issues de station de traitement pour la production de produit à valeur ajoutée, tel que les biopesticides, constituent une alternative intéressante dans la mise en valeur des technologies de développement durable. En effet, ces matières résiduelles contiennent une forte concentration de la demande chimique en oxygène (DCO), sous la forme de carbone et de sources d'azote (amidon, gluten, protéines, fibres et autres minéraux) (Malladi et Ingham, 1993; Rajasimman et Karthikeyan, 2007 ; Annachhatre et Amatya, 2000; Rajbhandari et Annachhatre, 2004 ; Mehani and Bouchekima, 2015, koutinas et al. 2014, Balasubramanian and Tyagi 2016). Ainsi, elles nécessitent souvent des traitements importants avant leur disposition dans l'environnement.

C'est dans ce cadre qu'intervient cette étude qui contribuera à développer des substrats à partir des matières résiduelles pour la culture de Btk, lesquels sont enrichis à l'aide des milieux semi-synthétiques. Ce faisant, le potentiel entomotoxique élevé du biopesticide permettra d'augmenter la productivité du procédé par dilution des formulations développées. Enfin, l'usage de la coagulation et de la floculation servira de technique complémentaire à la centrifugation dans la concentration des matières actives de Btk.

Ce chapitre 1 comporte 4 différentes parties : La première aborde une synthèse bibliographique afin de définir les objectifs de cette étude. La deuxième partie décrit les problématiques spécifiques de cette étude dans la production de biopesticide à base Bt, à partir des matières alternatives. La troisième partie présente les hypothèses et les objectifs de cette étude. Enfin la dernière partie expose la démarche méthodologique ainsi que les principaux résultats et discussion découlant des différents travaux menés dans cette étude.

1. Revue de littérature

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Le *Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie en forme de bâtonnet, aérobie, gram-positif, sporulée, qui forme un cristal protéique parasporal au cours de la phase stationnaire de son cycle de croissance. Cette bactérie est un agent entomopathogène dont l'activité insecticide a été attribuée en grande partie ou entièrement (en fonction de l'insecte) aux cristaux parasporaux (Schnepf *et al.*, 1998). Ces inclusions parasporales contenant les cristaux protéiques insecticides ou δ -endotoxines (Toxines Cry : Nomenclature de toxines de Bt), qui, codées par des gènes cry, ont des activités insecticides contre les espèces de l'ordre des lépidoptères et contre certaines larves de diptères (mouches et moustiques) et de coléoptères (scarabées), (Palma leopoldo *et al.* 2014). Ainsi, Bt synthétise un important réservoir de toxines Cry et de gènes cry pour la production d'insecticides biologiques et éventuellement de cultures génétiquement modifiées et résistantes aux insectes nuisibles.

1.1.1 Distribution de Bt

Bt est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans le sol (Vilas-Boas et Franco Lemos, 2004), dans le phylloplane des plantes, dans les feuilles, (Alper mehlika *et al.* 2014), chez des

insectes et dans les grains entreposés. Au cours des dernières années, Bt a été retrouvé dans des eaux douces (Ichimatsu *et al.*, 2000) et dans des boues activées (Mohammedi *et al.*, 2006). Lee *et al.* (2002) ont signalé la présence de Bt dans des excréments d'animaux.

Bt se cultive facilement sur milieu artificiel où milieu synthétique (Nickerson et Bulla, 1974). En milieu liquide, lorsque la population cellulaire a atteint un maximum, les cellules végétatives sporulent. Du point de vue biochimique, la sporulation extensive peut être initiée par la privation de nutriments essentiels tels que le glucose, l'ammoniaque, le phosphate ou autre (Tzeng et Liu, 2000 ; Ben khedher et al. 2014) dans le milieu de culture.

1.1.2 Formation des spores (sporulation)

Bt se cultive facilement sur milieu artificiel. Par exemple, un milieu synthétique a été développé pour la culture d'une grande variété de souches de Bt (Nickerson et Bulla, 1974 ; Valicente hercos et al. 2010). En milieu liquide, lorsque la population cellulaire a atteint un maximum, les cellules végétatives sporulent. Du point de vue biochimique, la sporulation extensive peut être initiée, par la privation de nutriments essentiels, tels que le glucose, l'ammoniaque, le phosphate ou autre (Ben khedher et al. 2014). La formation d'une endospore (l'état de dormance de Bt) est un processus de division cellulaire qui inclut la formation de protoplastes, dans le cytoplasme de la cellule (Setlow peter, 2014). La séquence du développement des spores et de la formation des cristaux parasporaux chez Bt est résumée selon les étapes classiques de la sporulation : la phase I (7 h), la formation de filament axial dans lequel il n'y a pas d'implication apparente des mésosomes avec le nucléole; la phase II (7 à 8 h), formation de septum d'avant-spore impliquant les mésosomes; la phase III (8 à 9 h), la formation d'engouffrement avec la participation des mésosomes, première apparition d'inclusions ovoïdes et de cristaux parasporaux, changement dans la capacité de la teinte des membranes et du cytoplasme et formation de la pré-spore; les phases IV à VI (9 à 12 h), formation de l'exosporium, paroi cellulaire primordiale, cortex et manteaux de spore accompagnée par la transformation de la nucléoïde de spores; la phase VII (après 12 h), maturation des spores (Bechtel et Bulla, 1976 ; Tan and Kumaran 2014). Notons que les spores à maturité ou les spores après la lyse cellulaire (phase VII) ont plusieurs couches distinctes. À partir de la membrane intérieure, elles sont situées comme suit : paroi cellulaire primordiale, cortex, membrane externe, cytoplasme de la cellule mère incorporée, couche de spore lamellaire, couche externe fibreuse de spores et l'exosporium.

1.1.3 Rôle des spores et de leur paroi sur les insectes nuisibles

L'entomotoxicité des spores de Bt contre *Manduca sexta* a été démontrée par Schesser et Bulla en 1978. Le pourcentage de mortalité larvaire était corrélé avec le contenu en poids sec des spores. Sur une superficie de 6,8 ng/cm², il y avait 85% de survie, mais moins de 50% ont survécu à 68,2 ng/cm². Il se trouve qu'il y a une similitude frappante entre l'action des spores et celle des cristaux parasporaux, c'est-à-dire l'inhibition de la croissance du sphinx du tabac. Les effets entomotoxiques des spores de Bt contre les larves d'insectes sont reliés à l'action de leur paroi qui contient la même composante que la pro-toxine cristalline des cristaux parasporaux (Schesser et Bulla, 1978; Azzouz et al. 2015). Dans certains cas, les spores de Bt sont impliqués dans son entomopathogénicité (Dubois et Dean, 1995; Johnson et McGaughey, 1996; Li *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1998 ; Azmi et al. 2015). Il a été suggéré que l'effet toxémique des cristaux protéiques, crée des conditions favorables au développement de la bactérie dans l'intestin des larves d'insectes affaiblies (Schnepf *et al.*, 1998). Ensuite, les bactéries peuvent envahir l'hémolymphe et provoquer une septicémie. Il est probable que les spores agissent en synergie avec l'endotoxine et celle-ci peut aussi résulter de leur germination dans l'intestin moyen avec la production d'une variété de facteurs pathogènes par les cellules végétatives tels que phospholipase C, hémolysines et entérotoxines (Salamitou *et al.*, 2000), y compris certaines protéines insecticides végétatives, les VIPs (Estruch *et al.*, 1996; Aronson,2002).

1.1.4 Mode d'action de l'endotoxine Cry1A contre les lépidoptères

En général, les endotoxines Cry qui constituent les inclusions cristallines sont suffisamment létales pour tuer les larves d'insectes infectées. Lorsqu'ils sont ingérés par les larves d'insectes sensibles, ces cristaux de protéines sont dissous et activés dans le tube digestif des insectes. Ils se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules épithéliales de l'intestin moyen, provoquant des pores transmembranaires et causant la lyse cellulaire. Cette toxémie peut entraîner par elle-même la mort des larves d'insectes (Grochulski *et al.*, 1995; Adang Michael et al. 2014). Le mécanisme d'action des protéines Cry de Bt est présenté dans la Figure 1.

En particulier, les endotoxines Cry1A produites comme inclusions cristallines doivent être ingérées par les larves sensibles pour y être toxiques. Ces cristaux sont dissous dans le milieu

alcalin et réductif de l'intestin moyen des larves, ce qui libère des pro-toxines solubles de 130 kDa et les pro-toxines inactives solubilisées sont clivées par des protéases de l'intestin moyen en fragments de 60-70 kDa contenant des protéines résistantes aux protéases (Bravo *et al.*, 2007). L'activation de l'endotoxine implique l'élimination protéolytique d'un peptide N terminal (25-30 acides aminés pour Cry1 toxines, 58 résidus pour Cry3A et 49 résidus pour Cry2Aa) et environ la moitié des protéines reste à partir du C-terminal dans le cas des longues pro-toxines Cry. L'endotoxine activée se lie à des récepteurs spécifiques sur la membrane de la bordure en brosse des cellules cylindriques de l'épithélium de l'intestin moyen (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007) avant de s'insérer dans la membrane. L'insertion de l'endotoxine entraîne la formation de pores lytiques dans les microvillosités des membranes apicales (Aronson et Shai, 2001). Ultérieurement, la lyse cellulaire et la perturbation de l'épithélium de l'intestin moyen libèrent les composantes cellulaires permettant la germination des spores qui provoque une septicémie sévère et la mort des insectes (Senthil-Nathan, 2015).

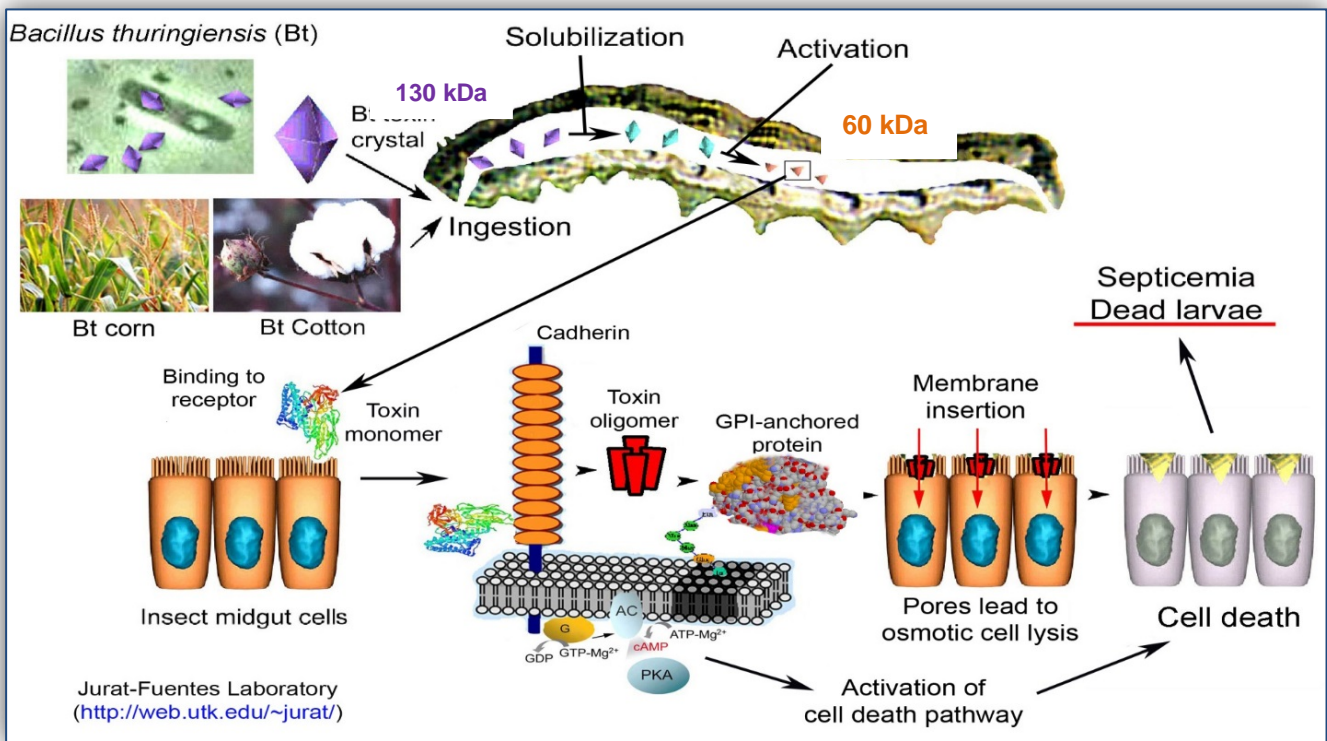


Figure 1: Mécanisme de la toxicité des protéines Cry de Bt (modifié à partir de Whalon et Wingerd, 2003).

1.1.5 Protéases de Bt

Pendant la croissance, Bt peut produire certains types de protéases nécessaires pour hydrolyser des protéines dans les milieux synthétiques ou complexes. Ainsi, une métalloprotéase (37,5 kDa; pH optimal de 6,5-7,5) a été produite par Bt var. kurstaki HD-1 (Btk HD-1) dans un milieu synthétique (Li et Yousten, 1975); quatre protéases ont été fractionnées et caractérisées dans le milieu du bouillon de fermentation (Zouari et Jaoua, 1999); une protéase sérine thermostable (34 kDa, ayant une activité maximale à 70°C et à un pH de 8,5-9,0) produites par Bt var. kurstaki HD-255 en milieu synthétique (Kunitate *et al.*, 1989); deux des protéases neutres et alcalines ont été produites au cours de la croissance de Btk HD-1 par croissance dans les boues d'épuration (Tyagi *et al.*, 2002), etc. En outre, il a été constaté que certaines protéases alcalines sont associées à des cristaux protéines insecticides (Bulla *et al.*, 1977; Chestukhina *et al.*, 1980; Lee Seok *et al.* 2016).

Jusqu'à présent, le rôle de la protéase dans l'accroissement ou la diminution de l'activité insecticide des delta-endotoxines ou endotoxines contre les insectes nuisibles n'a pas été confirmé. Il convient de mentionner à nouveau que, après ingestion par des insectes sensibles, les cristaux sont solubilisés par le milieu alcalin de l'intestin des insectes et les cristaux protéiques solubilisés (les pro-toxines pleine longueur et inactifs) sont transformés en fragments plus petits et entomotoxiques. Deux sources d'activités protéolytiques sont capables de traiter et/ou de dégrader les cristaux protoxines :

(a) l'activité protéolytique (dans l'intestin moyen) hydrolyse les pro-toxines en toxines actives (Haider *et al.*, 1986; Ogiwara *et al.*, 1992; Chakroun Maissa, 2015);

(b) au cours de la sporulation, Bt synthétise des enzymes protéolytiques (Brar *et al.*, 2007), et cette activité protéolytique peut traiter et/ou dégrader les cristaux protéiques (Andrews *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1989; Jurat-Fuentes *et al.* 2012).

En fait, ils peuvent dégrader les protéines insecticides. Toutefois, leur absence ou leur présence ne modifient pas l'activité biopesticide des cristaux protéiques de Bt qui sont spécifiquement entomopathogéniques contre les lépidoptères (Tan et Donovan, 2000 ; Ennouri Karim *et al.* 2013). Toutefois, dans certains cas, l'inhibition de la protéase alcaline pourrait augmenter

l'activité insecticide de Bt (MacIntosh *et al.*, 1990 ; Lomate et Vandana 2013). Ainsi, le rôle de ces protéases dans l'activité insecticide doit être vérifié (Brar *et al.*, 2007).

1.2 Cycle de vie de la tordeuse et techniques de répression

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (*choristoneura fumiferana* (clem.)) est un insecte indigène en Amérique du Nord. Elle constitue une source majeure de problèmes environnementaux et économiques dans l'industrie du sapin et de l'épinette. Son mode de vie cyclique à travers les forêts du pays lui procure cette importance. Son aire de distribution correspond approximativement à celle du sapin. Au Canada, cette tordeuse se rencontre sur 25 essences résineuses dont huit espèces d'épinette, six de pin, cinq de sapin. Trois de pruche, deux de mélèze et une de genévrier. Le sapin est son hôte de prédilection, mais l'épinette blanche et rouge sont aussi très affectées. Le cycle biologique de la tordeuse de l'épinette comporte une génération par année comparativement aux régions élevées de l'ouest canadien où il s'étale sur deux ans (Morneau, Louis, 2014). Dans l'est du Canada le papillon sort en juillet et il est présent jusqu'au début de septembre. Les femelles déposent leurs œufs sur les aiguilles, de préférence sur les pousses exposées aux rayons du soleil. Ils sont groupés à la surface de l'aiguille, en masse de 10 à 20, adossés les uns aux autres. L'incubation dure de 7 à 10 jours. Dès son éclosion, la chenille néonatale se dirige vers l'intérieur de la cime à la recherche d'un abri pour l'hiver, soit dans les anfractuosités de l'écorce, les lichens ou les cupules des fleurs staminées. Une fois installée, la chenille se tisse une toile de soie en forme d'abri et, après avoir mué une première fois, elle tombe en léthargie pour l'hiver. Dès les premiers jours de printemps, la chenille rebrousse chemin et se dirige vers l'extérieur de la cime en quête de nourriture. Elle recherche les fleurs staminées de l'année en leur absence, mine une ou plusieurs vieilles aiguilles pour subsister jusqu'à l'ouverture des bourgeons. Dès que ceux-ci montrent des signes d'activité, elle s'attaque aux jeunes aiguilles en train de se développer. Quand les pousses ont atteint une certaine taille, la chenille se réfugie à l'intérieur d'une espèce de cachette qu'elle se fabrique en reliant deux pousses voisines avec un fil de soie qu'elle tisse au fur et à mesure de sa descente pour s'installer à un niveau plus bas sur la cime ou pour être transportée sur de grandes distances par le vent. Lorsque le nouveau feuillage devient rare à cause d'une population trop élevée, la chenille attaque le vieux feuillage. Vers la fin de juin et le début de juillet la chenille se transforme en chrysalide, dans la cime à travers les aiguilles mortes et les déchets, retenue en place par des fils de soie ou attachée à un support par l'extrémité de son abdomen. Les papillons éclosent au bout d'une dizaine de jour

et l'exuvie chrysalidale reste en place pendant un certain temps avant d'être emportée par le vent ou désagrégée par les intempéries (Royama Tomo-O, 1984 ; Hajek and Frankenhuyzen 2017).

1.2.1 Dégâts

Les dégâts de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sont commis par les chenilles lors de leur alimentation et ils sont surtout accentués lors du dernier âge larvaire. On sait que la chenille s'attaque de préférence aux aiguilles de l'année courante qu'elle dévore en entier ou en partie suivant l'abondance de la population; en période de pullulation intense toutes les nouvelles pousses sont parfois consommées très tôt dans la saison, c'est-à-dire à peine sorties des bourgeons. La destruction d'une année de feuillage n'a généralement pas de conséquences graves, car il reste assez de feuillage dans les cimes pour maintenir les arbres en vie. On sait que les résineux conservent le feuillage d'une saison plusieurs années; dans le cas du sapin, cette période est d'environ sept ans. La situation devient plus critique si la défoliation se répète plusieurs années consécutives parce que le feuillage s'éclaircit progressivement (Ruel and Huot, 1993). Les sapins commencent généralement à succomber à la suite de quatre années graduellement pendant les cinq années suivantes, même après la fin de l'invasion, pour atteindre un niveau moyen de 50%.

La mortalité du sapin est accélérée et intensifiée lorsque les populations s'élèvent au point que les chenilles s'attaquent au vieux feuillage. Dans ce cas, les chenilles tombent en grand nombre sur les jeunes sapins croissant en sous-bois et ceux-ci sont souvent détruits bien avant les grands arbres. Dans le cas où les sapins jouissent d'une ou deux années de répit à cause d'une baisse de population de l'insecte, les bourgeons qui ont réussi à échapper à la destruction se développent normalement et un ou deux bourgeons latéraux peuvent remplacer le bourgeon terminal détruit. La cime se développe alors en forme de baïonnette, témoin important du passage de la tordeuse (Rossi Sergio and Hubert Morin, 2011).

Les défoliations répétées entraînent également une réduction de la croissance. Chez le sapin par exemple, un intervalle de trois à six ans s'écoule entre la première défoliation sévère et une diminution de la croissance, et d'après McLintok (1955) elle atteint 60 à 73% après cinq ans.

Production de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* par fermentation

1.3 Paramètres de fermentation

1.3.1 La composition du milieu de culture

Le choix du substrat pour la fermentation de *Bacillus Thuringiensis* est conditionné par des choix économiques et d'efficacité. L'usage d'un milieu semi-synthétique tel que le milieu de soja garantit l'apport des nutriments essentiels et basiques pour la croissance optimale et la synthèse d'éléments secondaires par la bactérie (Perani et bishop, 2000). Alors que, les produits secondaires issus des industries agroalimentaires ou des stations d'épurations constituent des alternatives aux produits synthétiques. En effet, Barnabé et al. 2009 révèlent que les cristaux protéiques provenant de substrat complexe sont plus létaux que ceux des milieux à substrat facilement assimilable (synthétique). En effet, le pouvoir insecticide de Bt dépend de l'activité intrinsèque de la bactérie (diversité des toxines) ainsi que de la composition du substrat de fermentation (Khuzamshukurove et al., 2001) et l'approvisionnement en milieu de culture durant la fermentation. Perani et Bishop (2000) ont observé que la composition du milieu de culture affecte la concentration des delta-endotoxines, la taille et la forme du cristal et par conséquent le potentiel entomotoxique. L'optimisation du milieu de culture est associée à un large nombre de paramètres physiologiques et nutritionnels, entre autres, la concentration en azote et carbone (le rapport C/N), sans négliger les minéraux. Plusieurs chercheurs ont montré que le processus de formation des spores et de synthèses des cristaux dépend du rapport azote/carbone.

À travers la relation étroite entre la formation du cristal et la sporulation, la régulation par les sources de carbone peut être considérée comme un contrôle direct de la formation de l'inclusion parasporale, ou encore un effet indirect résultant de la stimulation ou de la suppression de la sporulation (Içgen et al., 2002b; Zouari et al.,1998; Devidas et al. 2014). Généralement, l'absence de source de carbone inhibe la sporulation (Nickerson et Bulla, 1974; Ennouri et al 2013). Un changement de la source de carbone provoque des variations au niveau de la croissance de Bt et de la taille du cristal (Farrera et al., 1998). L'azote semble être le facteur le plus déterminant lors de la multiplication cellulaire et de la sporulation puisqu'il intervient dans la synthèse des protéines cellulaires, des enveloppes des spores et dans la synthèse des acides nucléiques. Les sources d'azote exercent un contrôle direct sur la

formation du cristal par stimulation de la production des endotoxines; Pearson et Ward, 1988; Vu et al. 2010). Yang et Wang (2000) ont conclu que l'épuisement des sources d'azote organique et inorganique dans le milieu de culture, au début de la synthèse des protéines toxiques, déclenche la sporulation et la synthèse des cristaux.

1.3.2 Température et pH de fermentation

L'effet de la température de culture de Bt varie en fonction du milieu de culture, des modifications génétiques et des phases de croissance. Les cellules de Bt croissent mieux pour une plage de température comprise entre 28 et 32°C (Dulmage *et al.*, 1990, Yang et Wang, 2000). Cette stratégie permet de réduire le temps de fermentation et la demande en oxygène de la culture, et donc les coûts de fermentation liés à l'énergie fournie lors de l'agitation et de l'aération (Yang et Wang, 2000).

La sporulation des bactéries est réduite à un pH supérieur à 7,6 et diminue considérablement à pH 6. Elle est inhibée sous 5,5 (Salama *et al.*, 1983). Braun (2000) a observé plus de spores à pH neutre qu'à pH 6 ou 8.

1.3.3 Optimisation de l'inoculum

La durée de la phase exponentielle dépend de la disponibilité, de la nature des nutriments présents dans le milieu de culture et, surtout, de l'âge et de la physiologie de l'inoculum (Barnabé et al. 2009). Un inoculum de bonne qualité garantit une phase de latence plus courte, une meilleure croissance et une réduction du temps de culture. Les variables qui affectent l'inoculum se résument à sa préparation, son volume et son âge.

Lachhab *et al.* (2001) ont proposé de préparer la culture de départ à partir du substrat de fermentation. Ceci permet de réduire le temps d'adaptation et d'améliorer le taux de croissance spécifique, la sporulation et l'entomotoxicité.

L'utilisation d'un volume d'inoculum relativement faible (1%) ou encore de plus grands volumes (4-5%) provoque une diminution du potentiel entomotoxique (Lachhab *et al.*, 2001). Une forte concentration cellulaire initiale pourrait induire une consommation rapide de l'oxygène et des autres nutriments. Par conséquent, une limitation de ces éléments devrait amener de faibles

taux de croissance. Un volume optimum d'inoculum de 2% a été retenu parce qu'il assure une meilleure concentration cellulaire sans entraver la concentration d'oxygène dissoute (Ndao et al. 2017).

L'âge de l'inoculum joue un rôle important dans le temps d'induction de la sporulation. Il est préférable d'inoculer le milieu avec une culture active en phase de croissance exponentielle, 9 heures après inoculation (Ndao et al. 2017). Les cellules en division sont plus énergiques (mobiles) et leur métabolisme de synthèse d'enzymes inductibles est plus actif.

1.3.4 Transfert d'oxygène

Le transfert d'oxygène jusqu'au sein du milieu de culture constitue un problème critique. Il a été démontré lors du transfert d'oxygène depuis la bulle d'air jusqu'aux systèmes enzymatiques internes de la cellule microbienne (Figure 2), le passage de l'oxygène au sein du liquide est l'étape qui offre la plus grande résistance (Arnold et Steel, 1958 ; Stanbury Peter et al. 2013).

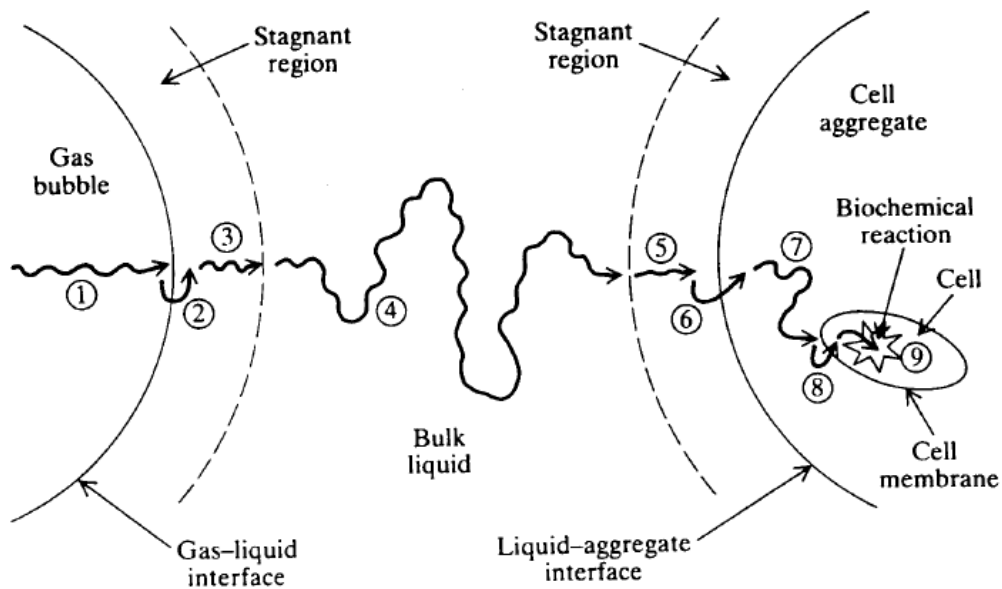


Figure 2: Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995).

1. Transfert de l'O₂ depuis l'intérieur de la bulle vers l'interface gaz-liquide
2. Mouvement à travers l'interface gaz-liquide

3. Diffusion à travers la région stagnante ceinturant la bulle
4. Transport à travers le milieu de culture
5. Diffusion à travers la zone stagnante entourant la cellule
6. Mouvement à travers l'interface liquide + cellule
7. Transport à travers le cytoplasme vers les sites de réaction

1.3.5 Agitation du milieu

Les processus physiques qui déterminent la taille des bulles dans les fermenteurs sont l'aération et l'agitation. Ces processus ont une influence importante sur le taux de transfert d'oxygène. La couronne d'aspersion de l'air est normalement positionnée dans l'axe central des pâles. Ces dernières offrent une agitation mécanique et distribuent l'air sous forme de petites bulles dans le fermenteur. Lorsque l'oxygène est présent dans la surface agitée, il est aspiré dans les cavités à basse pression derrière les pâles de la turbine (Bates Robert et al. 2012). Ces cavités réduisent la résistance à l'écoulement du fluide et la diminution du coefficient de traîné de l'agitateur. Comme les aubes de la turbine tournent à grande vitesse, les petites bulles d'oxygène sont éjectées à l'arrière des cavités dans la masse liquide sous l'influence de la dispersion du processus. Une représentation schématique du débit d'air (aération) et de la vitesse de la turbine (agitation) est représentée sur la Figure 3. Différentes configurations d'écoulement de l'oxygène se développent en fonction du taux relatif d'entrée de l'oxygène et de l'agitation. Si le niveau de vitesse d'agitation est faible et le taux d'alimentation en oxygène est élevé, le motif d'écoulement de gaz est dominé par des flux d'air le long de l'axe de l'agitateur comme le montre la Figure 3(a). Ce modèle d'écoulement est appelé « inondation de la pale d'agitation » et représente une mauvaise dispersion du mélange de l'oxygène. Quand la vitesse de la turbine augmente, l'oxygène est capturé derrière les pâles de l'agitateur et est dispersé dans le liquide. La Figure 3(b) montre la vitesse d'agitation minimum nécessaire pour disperser complètement l'oxygène. Avec de nouvelles hausses des vitesses d'agitation, de petits motifs de recirculation commencent à émerger, comme indiqué dans les Figures 3(c) et 3(d). Le modèle de dispersion souhaitée est illustré à la Figure 3(e).

Les bouillons de fermentation varient dans leurs propriétés en fonction du produit désiré. Aussi, la viscosité du bouillon peut changer pendant la fermentation. De plus, augmenter, dans les conditions typiques de fonctionnement du fermenteur, la vitesse d'agitation améliore le transfert d'oxygène. Ahmad *et al.* (1994) ont constaté que l'augmentation de transfert d'oxygène de 8,94

à $38,63 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ est obtenue quand la vitesse d'agitation est élevée de 300 à 600 tours/min. L'augmentation de la vitesse d'agitation est la méthode traditionnelle utilisée pour améliorer le taux de transfert d'oxygène. Plus le produit est agité, plus la dispersion de l'oxygène est créée, et plus le gaz dispersé entraîne un meilleur transfert d'oxygène.

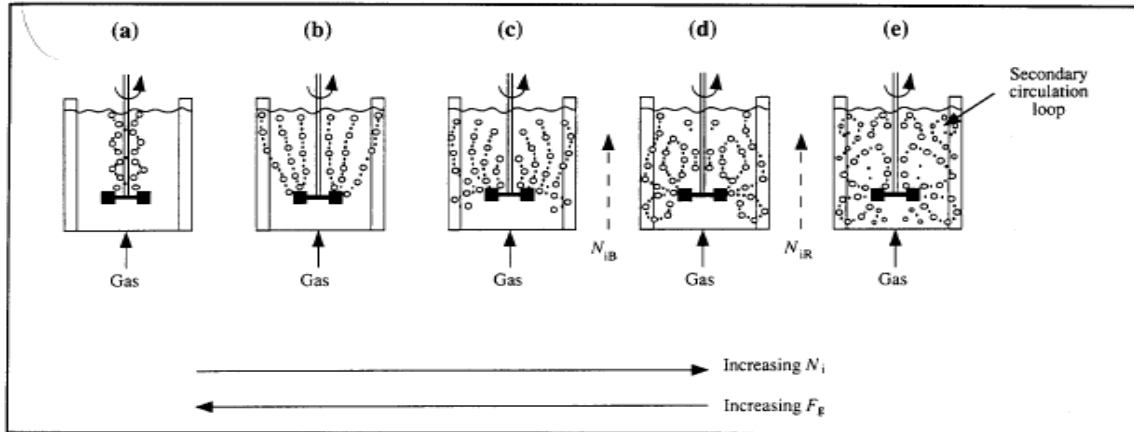


Figure 3 : Distribution des bulles d'air en fonction de l'agitation et du flux d'air (Doran, 1995).

La formation des spores et la synthèse de cristaux sont étroitement dépendantes de la disponibilité d' O_2 dans le milieu de culture (Zouari *et al.*, 2002a; Abbas Aicha *et al.* 2014). Ce transfert d'oxygène est fonction du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K_{La}). Ce dernier caractérise le transfert gaz-liquide, dont l'équation aux dimensions est exprimée en inverse du temps. C'est aussi l'un des facteurs les plus importants pour la mise à l'échelle du procédé (Ndao *et al.* 2017). En pratique, la mesure de ce coefficient exprime la capacité d'oxygénation du milieu contenu dans le bioréacteur. Il est couramment utilisé pour mesurer le taux de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation d'oxygène (OUR). Les paramètres qui affectent le transfert d'oxygène dans un réacteur type « cuve agitée » et les performances du procédé de fermentation de Bt sont illustrés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée

Paramètres	Effet sur le transfert d'oxygène	Références
Viscosité	La viscosité est la principale différence significative entre les milieux de fermentation commercialisés. Il a été observé que le K_{La} variait au cours de la fermentation et qu'il dépendait de la viscosité apparente	Ozergin–Ulgen et Mavitama (1998) Ozbek et Gayik (2001)

	du milieu. L'augmentation de la viscosité fait diminuer les valeurs du K_{La}	Humphrey (1998)
Température	Une diminution de la solubilité des gaz est observée lors d'une augmentation de la température. Néanmoins, le K_{La} s'accroît suite à une augmentation de la diffusion de l'oxygène dans le liquide. Le taux de transfert de l'oxygène augmente de 15% lorsque la température passe de 20 à 30°C.	Doran (1995)
Sels	Pour de fortes concentrations en sels, le K_{La} et la solubilité de l'oxygène diminuent et contribuent à la baisse du transfert de l'oxygène.	Imai <i>et al.</i> (1987) Kappeli et Fiechter (1981)
Agitation et aération	Le K_{La} augmente avec la vitesse de rotation des turbines et le taux d'aération. L'influence de la vitesse de rotation sur le K_{La} est plus importante que celle de l'aération	Abdel-Hameed (2001)
Vélocité superficielle	Le K_{La} augmente significativement pour un accroissement de la vélocité superficielle du gaz. Les petites bulles d'air permettent d'avoir une surface interstitielle plus importante que les grosses bulles d'air. Un autre avantage des bulles est que leur vitesse d'ascension à la surface est plus lente. Elles restent donc plus longtemps dans le liquide accordant plus de temps à l'oxygène pour se dissoudre. Le diamètre des bulles d'air couramment utilisé dans les fermentations industrielles varie entre 1,5 à 10mm.	Doran (1995) Juarez et Orejas (2001)
Anti-mousse	L'antimousse affecte le comportement et les interactions hydrodynamiques des bulles ainsi que le taux de transfert de masse. Une baisse de la tension de surface augmente le diamètre moyen des bulles et fait donc baisser le K_{La} .	Al masry (1999)

1.4. Techniques de formulation

1.4.1 Récolte - Centrifugation et autres

Les bouillons fermentés comprennent des cristaux protéiques, des spores, des débris cellulaires et des particules solides résiduelles avec d'autres facteurs de virulence qui doivent être récoltés de façon économique pour l'étape subséquente de la formulation (Rowe et Margaritis, 2004 ; Laloo Rajesh et al. 2010). La plupart des produits commerciaux de Bt contiennent des cristaux protéiques insecticides (CPI) et des spores viables. Pendant la production à grande échelle de Btk, il pourrait y avoir une perte importante d'ingrédients bioactifs durant la centrifugation. Celle-ci est souvent due à la méthode de récolte utilisée. Au début, le procédé de lactose-acétone a été utilisé comme technique de laboratoire pour récolter des spores de Bt (Dulmage et al., 1970; Dulmage et Rhodes, 1971). Cependant, l'utilisation des méthodes avancées telles que l'ultracentrifugation, la microfiltration et la filtration sous vide pour séparer les particules insolubles (ingrédients actifs) du liquide (fraction inerte) du bouillon fermenté, a donné des résultats probants lors de la récolte des composantes actives (des lipases et des protéines) (Gulati et al., 2000; Boychyn et al., 2000). Le séchage par pulvérisation a été communément utilisé pour produire des formulations à partir de grands volumes de bouillons fermentés. Le séchage peut être précédé d'une étape d'épaississement par centrifugation ou filtration du bouillon fermenté en présence d'additifs comme le celite (facilite l'épaississement) (Bonnefoi, 1963; Tamez-Guerra *et al.*, 1996). Une récolte efficace du complexe actif spore-cristal de Bt a été documentée en utilisant soit une centrifugeuse à disques empilés ou soit un appareil de filtration à vide avec une efficacité de récolte de spores de plus de 99% (Zamola et al., 1981). Adjalle et al. 2007 ont montré que ses composés pourraient être récupérés après une ultrafiltration suivi d'une centrifugation, si un grand volume de surnageant est utilisé.

1.4.2. Principe de coagulation et floculation.

La turbidité et la couleur d'une eau sont principalement causées par des particules très petites, dites particules colloïdales (tableau 2). Ces particules, qui peuvent rester en suspension dans l'eau durant de très longues périodes, peuvent même traverser un filtre très fin. Par ailleurs, du fait de leur grande stabilité, elles n'ont pas tendance à s'accrocher les unes aux autres.

Pour éliminer ces particules, on a recours aux procédés de coagulation et de floculation. La coagulation a pour but principal de déstabiliser les particules en suspension, c'est-à-dire de faciliter leur agglomération. En pratique, ce procédé est caractérisé par l'injection et la dispersion de produits chimiques.

La floculation a pour but de favoriser, à l'aide d'un mélange lent, les contacts entre les particules déstabilisées. Ces particules s'agglutinent pour former un floc qu'on pourra facilement éliminer par décantation

Tableau 2: Ordres de grandeurs de diamètre des particules

Diamètre des particules (micromètre)	État	Exemple
< 0,001	État dissous	.
0,001 à 1	État colloïdal	Oxydes et hydroxydes Argile Huiles et graisses Bactéries
> 1	Solides décantables	Limon Sables Pollen

1.4.3 Structure des colloïdes

Dans une eau de surface, les colloïdes portent des charges négatives situées à leur surface. Ces charges négatives attirent les ions positifs en solution dans l'eau. Ceux-ci sont étroitement liés au colloïde et forment la couche liée ou de STERN, qui attire à son tour des anions accompagnés d'une faible quantité des cations : c'est la couche diffuse ou de GOUY. Il y a donc formation d'une double couche ionique l'un accompagnant la particule lors de ces déplacements, l'autre se déplaçant indépendamment ou avec un certain retard (figure 4).

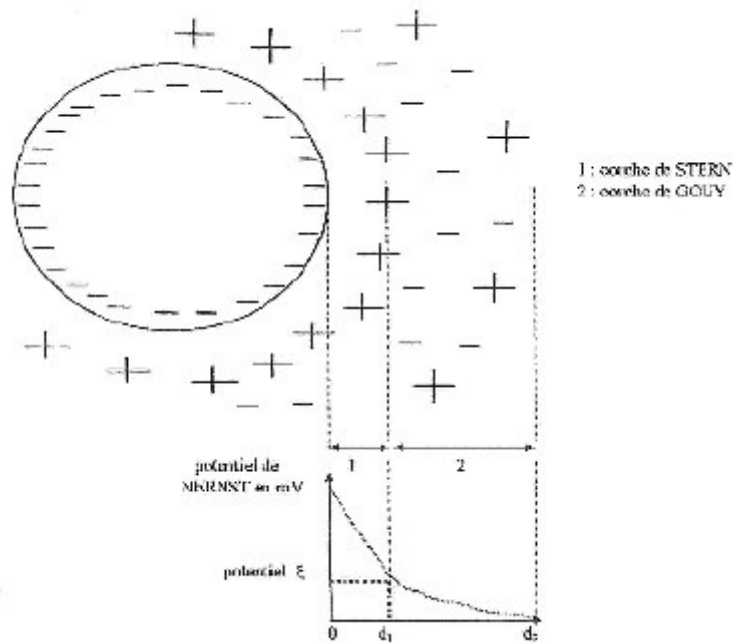


Figure 4: Potentiel Zêta

Il existe entre ces deux couches un potentiel électrostatique ou de NERNST, qui varie en fonction de la distance par rapport à la surface du colloïde. Dans la couche liée, le potentiel de NERNST décroît linéairement car les cations constitutifs sont empilés uniformément. En revanche, dans la couche de GOUY, le potentiel électrostatique varie de manière non linéaire, étant donné que la répartition ionique résulte d'un mélange aléatoire de cations et d'anions. La valeur du potentiel à la surface de la couche de NERNST est appelé potentiel zêta. Les colloïdes étant chargés négativement, ce potentiel est négatif. Dans les eaux naturelles, sa valeur varie de -30 à -35 mV. Les particules de potentiel zêta négatif se repoussent très fortement. C'est pourquoi, les colloïdes sont très stables et inhibent toute agglomération.

1.4.4 Les coagulants et les flocculants chimiques

Plusieurs agents chimiques peuvent être employés dans le procédé de coagulation-floculation. Les sels métalliques sont indéniablement les coagulants les plus utilisés dans le monde actuellement. Récemment, plusieurs types de coagulants et de flocculants inorganiques sous

formes de polymères ont été développés et sont maintenant largement utilisés en Chine, au Japon, en Russie et Europe de l'Est (Wang et al . 2004). D'autres recherches montrent que l'utilisation de polymères d'origine biologique est une avenue forte prometteuse.

1.4.5 Les coagulants de type sels métalliques

Ce type de coagulants peut être utilisé pour traiter des eaux usées industrielles et domestiques, mais son applicabilité s'étend aussi à plusieurs autres domaines: réduction adoucissement de l'eau, enlèvement des métaux lourds (industrie métallurgique), enlèvement des huiles et des graisses, enlèvement du phosphate des eaux de lavage et de d'autres type d'effluent, etc. Ces agents chimiques sont donc d'excellents outils pour réaliser le polissage et la récupération des matières particulaires. Plusieurs sels métalliques sont utilisés dans le domaine du traitement des eaux usées, voici un aperçu des principaux :

Oxyde de Calcium - CaO (lime). Il produit du carbonate de calcium dans l'eau usée et permet ainsi la coagulation des matières particulaires et de certains métaux. Il est généralement utilisé avec d'autres coagulants puisque de très grandes quantités de CaO sont souvent nécessaires, lorsqu'il est utilisé seul. De plus, il génère typiquement plus de boues que les autres coagulants (EPA, 2000a).

Sulfate Ferreux - Fe(SO₄). Il est généralement utilisé avec le CaO pour réduire la dureté de l'eau. La combinaison des deux coagulants génère du sulfate de calcium et de l'hydroxide ferrique. Les eaux usées doivent cependant contenir de l'oxygène dissout afin que la réaction puisse prendre place. (EPA, 2000a).

Alun - Al₂(SO₄)₃ x 14H₂O. Il est utilisé pour réduire la dureté ainsi que la charge en phosphate des eaux usées. En solution, il réagit avec les composés alcalins présents (carbonate, bicarbonate et hydroxyde) ou le phosphate pour former un sel d'aluminium insoluble. (EPA, 2000a).

Chlorure ferrique - FeCl₃. Il réagit selon l'alcalinité et la concentration en phosphate pour former un sel de fer insoluble (EPA, 2000a).

Plusieurs avantages et inconvénients accompagnent l'utilisation des agents chimiques présentés ci-dessus (Ndabigengesre et Narasiah, 1998 ; EPA, 2000a; Semerjian et Ayoub, 2003). Il faut noter que ces sels métalliques peuvent être utilisés seuls ou combinés. Généralement, on les utilise avec un flocculant afin d'augmenter l'efficacité du procédé.

1.4.6 Les flocculants de type polymères (polyélectrolytes)

De manière générale, ce sont des composés de haut poids moléculaires 10⁴-10⁶ Da de types anioniques, cationiques ou non ioniques. L'intensité de la charge d'un polymère dépend de son degré d'ionisation qui dépend à son tour des charges sur les groupes fonctionnels, du degré de copolymérisation et de la quantité de groupes fonctionnels qui ont été substitués (Ebeling et al., 2005). En solution, ils ont un taux de diffusion relativement bas et ils augmentent la viscosité. Le brassage est donc nécessaire à la dispersion des polymères. Ils peuvent être employés pour la neutralisation, l'émulsion et/ou pour créer des ponts entre les particules colloïdales (EPA, 2000). Leur efficacité dépend généralement des paramètres suivants : la concentration du polymère, la charge globale et la densité de charge, le poids moléculaire, les caractéristiques de l'effluent et les paramètres physiques (dosage, énergie de brassage, pH, etc.).

Les polymères peuvent être utilisés seuls ou combinés avec les sels métalliques.

1.4.7 Les coagulants d'origine naturelle

Comme l'ont relevé certaines études, les coagulants à base d'aluminium, de fer et même les polymères synthétiques présentent un désavantage important : leur toxicité probante pour l'environnement. Cela a donc poussé quelques chercheurs à investiguer la possibilité d'utiliser des composés d'origine naturelle pour réaliser le procédé de coagulation-floculation (Ndabigengesere et Narasiah, 1998 ; Zolfaghari Ghasem et al. 2011).

1.4.7.1 Les polymères d'origine biologique

Les alginates de sodium sont extraits de l'acide alginique, un composé provenant d'algues marines. Ces produits sont particulièrement employés en combinaison avec les sels ferriques, mais peuvent donner de bons résultats avec les sels d'aluminium (Degrémont, 2005).

Obtenus de la pomme de terre, du tapioca ou d'autres végétaux, les polymères de glucopyranose non linéaires ramifiés sont utilisés de préférence avec les sels d'aluminium. Une fois dilués, leur biodégradation peut-être rapide (Degrémont, 2005).

Autres composés : Plusieurs polysaccharides naturels ont des propriétés floculantes (cellulose, gommés, tanins, xanthanes), mais ils sont très peu utilisés dans le traitement des eaux (Degrémont, 2005).

1.4.7.2 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide provenant de la désacétylation de la chitine, un composé grandement similaire à la cellulose (figure 5). On retrouve la chitine dans plusieurs écosystèmes puisqu'elle est une composante fondamentale de l'exosquelette des invertébrés marins (crabe, crevette, homard, etc.) et des insectes, en plus d'être une molécule structurante chez les champignons et les levures (Pan et al. 1999). Au niveau de sa disponibilité, on estime à plus de 150 millions de tonnes la quantité de

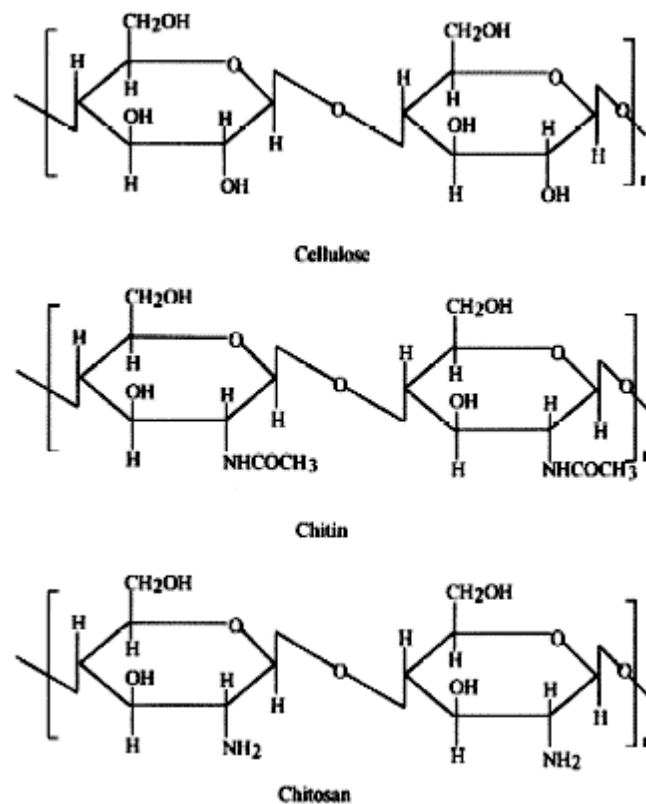


Figure 5 - Structure chimique de la cellulose, de la chitine et du chitosane (Ravi Kumar, 2000)

chitine pouvant être recyclée annuellement, une chitine qui provient essentiellement des usines de transformation des produits de la mer (Chavasit et Torres, 1990).

a) Caractéristiques physico-chimiques du chitosane

Au niveau de ses principales caractéristiques chimiques, le chitosane est un biopolymère linéaire polycationique possédant un poids moléculaire élevé et une certaine solubilité dans l'acide acétique (Huang et al ., 2000). Sa charge positive partielle, due à la protonation des groupements amines en solution, lui confère ainsi d'intéressantes propriétés en termes d'adsorption de composés organiques (Ahmad et al. 2011).

b) Domaines d'application

Traitement des eaux usées

Plusieurs études démontrent que le chitosane est un agent coagulant et flocculant efficace dans le traitement des eaux usées industrielles (production de volailles, d'oeufs, de fromage, de viande, de gâteaux aux fruits, de fruits de mer, Jun et al ., 1994. Des réductions de 70 à 98 % de la teneur en MES et de 55 à 80 % la demande chimique en oxygène (DCO) ont été observées pour ces eaux usées (Jun et al., 1994). Le chitosane peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres coagulants, tels les sels métalliques d'aluminium ou de fer.

Mis à part sa grande disponibilité, le grand intérêt à utiliser ce composé d'origine biologique comme agent flocculant provient du fait qu'il est biodégradable et non-toxique (Zemmouri et al. 2011). Actuellement, dans la majorité des cas, les particules colloïdales, comme les protéines ou les huiles, sont retirées à l'aide d'un procédé chimique de coagulation précipitation à l'aide de sulfate d'aluminium ou de chlorure de polyaluminium, deux agents coagulants efficaces et peu dispendieux (Pan et al ., 1999). Cependant, l'utilisation de ces sels d'aluminium peut causer une augmentation de la teneur en aluminium dans l'eau potable et ainsi avoir un impact considérable, à long terme, sur la santé humaine. McLachlan (1995) a démontré la relation entre les concentrations d'aluminium présentes dans l'eau et le risque de contraction de la maladie d'Alzheimer. L'aluminium peut aussi avoir des répercussions négatives sur les milieux naturels s'il s'y retrouve en trop grandes concentrations (Wang et al . 2004). Le chitosane apparaît, dans ce contexte, comme une alternative durable pour l'enlèvement des MES à cause de sa non répercussion sur la santé humaine et celle des écosystèmes à long terme. Cette non

toxicité a aussi permis d'étendre ces usages à l'industrie chimique, biomédicale, pharmaceutique et agroalimentaire (Wibowo et al., 2005). Le procédé de coagulation-floculation par ajout de chitosane est actuellement utilisé dans la moitié des cas de traitement d'eaux usées au Japon, et selon une proportion variable dans certains autres pays asiatiques. Cependant, en Amérique du Nord, son utilisation est quasi inexistante.

1.4.7.3 Acide tannique

Les tanins sont présents dans une grande variété de fruits et de légumes. (Deshpande et al. 1984; Ghouas et al. 2016). Les vins et les thés contiennent eux aussi des tanins, (Hoff and Singleton, 1977). Il est estimé que chaque jour un citoyen américain consomme 1 gramme d'acide tannique (figure 6) sous forme hydrolysée.

En tant que tannin hydrolysable, l'acide tannique contient un certain nombre de groupes adjacents hydroxyphényle, qui sont des ligands appropriés pour se combiner avec les ions de métaux lourds tels que le chrome, le cobalt et le fer pour former polyphénol-complexes métalliques et aux composés organiques (Nakajima et Sakaguchi., 2000). En outre, certains chercheurs ont rapporté que l'acide tannique, ayant un poids moléculaire faible, polyphénol végétal, peut être utile comme apport organique pour améliorer la fertilité et la productivité des sols (Muir James, 2011). Des études montrent qu'une coagulation avec du chlorure ferrique assistée par un flocculant tel que l'acide tannique a été réalisée pour l'élimination du phosphore dans les eaux usées. Les conclusions découlant de cette expérience peuvent être résumés comme suit: Au cours des processus de coagulation / floculation pour différents types d'eaux usées, l'acide tannique peut accélérer la vitesse de décantation des floccs, réduire le Fe résiduel (III) afin d'éliminer la coloration jaune due à Fe (III), et augmenter légèrement l'efficacité d'élimination du phosphore.

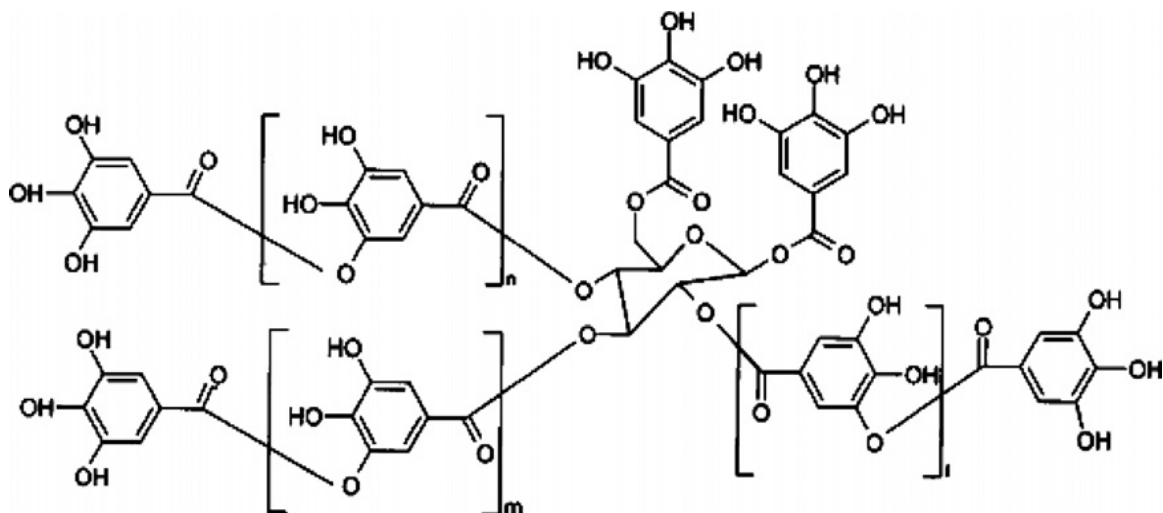


Figure 6 : Structure de l'acide tannique

1.5 DIFFERENTS TYPES DE FORMULATION

1.5.1. Différents types de formulation

Les biopesticides sont disponibles en différentes formulations qui se présentent sous plusieurs aspects et en deux catégories: Les formulations liquides (suspensions concentrées et émulsions) et les formulations solides (poudres humides, granules ou briquettes). Le choix du type de formulation dépend de plusieurs facteurs dont l'insecte ravageur visé, la durée d'action du potentiel insecticide, la nature de l'environnement à traiter ainsi que son accessibilité.

1.5.1.1. Les formulations solides

Ce sont souvent des formulations sèches sous forme de grains de poussières, de granules, de briquettes, de capsules et de poudres humides. Le choix du support de base dépend de la dureté, la densité et le taux de dilution du produit souhaité. Les grains de poussières de tailles comprises entre 5 et 20 μ m sont à base d'argile ou de silice de proportion variable en fonction de la densité désirée et la concentration en microorganismes est d'environ 10%. Il faut noter dans le cas d'une application directe sous forme de poudre, que les grains de poussières sont souvent emportés par le courant d'air à tel point que seuls 10% seulement atteignent la surface cible (Burgess, 1998). Les granules, capsules et briquettes sont à base de minerais d'argile, de polymère d'amidon, de fertilisants solides etc. La concentration en Bt varie entre 5 à 20% (Leggett Mary et al. 2011). Les granules pénètrent facilement le couvert végétal pour se rendre

dans l'eau du gîte. Pour cela elles sont utilisées lorsque la végétation interfère avec l'application aérienne du produit.

Pour leur application, les granules de volume compris entre 5-10 mm³ exigent un équipement d'une calibration précise avec une pulvérisation uniforme sans endommager le produit. Les formulations solides particulièrement les granules et les briquettes ont aussi l'avantage d'être distribuées ou pulvérisées facilement à la main (Burges, 1998). Ainsi, les équipements d'application vont d'une simple poignée de main à la pulvérisation par avion en passant par des tracteurs d'application. En ce qui concerne les formulations en poudres humides, elles commencent à prédominer parmi les produits commerciaux des biopesticides. C'est une formulation en poudre avec des additifs souvent près à être mélangés à l'eau peu de temps avant la pulvérisation. La formation de petites boules pâteuses (cake) pendant le mélange est à surveiller car elles peuvent boucher les pulvérisateurs. En effet, l'usage des silices en petite quantité aide à prévenir contre cette situation (Adjalle et al. 2011).

1.5.1.2. Les formulations liquides

Pour ce type de formulation, c'est le liquide qui joue le rôle de support. Les additifs de suspension, de dispersion et les surfactants permettent d'obtenir une bonne suspension du milieu liquide, d'où l'importance de leur choix. Il s'agit de trouver un équilibre entre la viscosité du milieu et la vitesse de décantation des particules. Les formulations liquides de Bt sont les plus largement utilisées (Leggett Mary et al. 2011) en raison de leurs facilités de manipulation et de leurs propriétés dispersantes en eaux courantes. Dans les suspensions, les dispersants diminuent le taux de la sédimentation de ces particules qui s'agglomèrent de façon réversible par floculation. Dans les formulations liquides, les surfactants sont identifiés par leurs caractères hydrophiles et lipophiles. Par contre, dans les émulsions, leur sédimentation est réduite à cause des surfactants qui ont une propriété stabilisatrice. En conclusion, la formulation des biopesticides permet d'obtenir, à partir des ingrédients actifs du bouillon fermenté et des différents agents/additifs de formulation, un produit final: (1) stable (pendant la production, la distribution et le stockage); (2) facile à appliquer sur le terrain (compatibilité avec les équipements, bonne performance et efficacité des différents types de formulation); (3) sans danger pour l'environnement et avec (4) avec un potentiel insecticide élevé par rapport aux insectes ou organismes cibles. Les caractéristiques et la rhéologie du milieu de culture jouent un rôle très important. En effet, contrairement aux biopesticides Bt produits à partir de milieux semi-synthétiques (comportement approximativement newtonien), ceux obtenus à partir de

boues d'épuration et des eaux usées d'industrie d'amidon ont une rhéologie complexe avec un comportement non-newtonien dont il faut tenir compte, d'où le développement d'une formulation propre et adaptée à ces milieux résiduels.

1.6. Effets environnementaux

Effet des ultraviolets (U.V) : Les formulations de Bt subissent une perte d'entomotoxicité résiduelle au contact des rayons UV sur le terrain (Cohen et al. 1991 ; Fang and Raymond 2012). La littérature est abondante au sujet de l'ajout d'agents protecteurs contre les rayons UV. Cependant, l'addition de ces agents et/ou la modification de la matrice de formulation sont des méthodes très coûteuses. Ce coût pourrait être diminué si le milieu de fermentation possédait des caractéristiques inhérentes capables d'offrir une résistance contre les rayons U.V. La lumière naturelle, en particulier la partie du rayonnement UV du spectre: UV-B (280-310 nm) et UV-A (320-400 nm) est principalement responsable de l'inactivation des insectes pathogènes. Plusieurs auteurs ont proposé l'implication des chromophores (exogène, possiblement les endogènes aussi) dérivée des milieux de fermentation, qui, après la lyse des cellules sont adsorbés sur les cristaux protéiques de Bt. Ces chromophores, absorbant à des longueurs d'onde de 300-380 nm, jusqu'ici ne sont pas caractérisés, passent leur état excité, de l'état électronique aux molécules d'oxygène, qui à leur tour sont converti en radicaux libre. Dans cet état, l'oxygène attaque des chaînes latérales de résidus d'indole du tryptophane sur la toxine de la protéine, ce qui entraîne une perte d'activité de l'insecticide. Cohen et al. 1991 ont suggéré l'utilisation de groupements cationiques tels que l'acriflavine et la rhodamine B pour transférer l'énergie à partir du tryptophane excité pour qu'il agisse comme bloqueur de rayonnement UV. L'Effet du rayonnement UV varie également selon les conditions climatiques, par exemple, la demi-vie de Bt aux Etats-Unis sur des plants de coton était de 30-48h et en Egypte sur les plants de ricin de 19-40h. De même, lorsque l'efficacité de la mélanine contre le rayonnement UV a été étudiée pour la protection de l'activité larvicide de Bt contre les moustiques, les tests biologiques ont confirmé un rôle important de la mélanine comme un agent photoprotecteur. Le plus gros problème avec l'utilisation de la mélanine serait la dissolution du pigment suite à l'exposition à la pluie. Les agents qui font écran contre le rayonnement UV qui absorbent entre une gamme de 300 et 400 nm devrait améliorer la persistance des produits Bt appliqués sur le feuillage. Plusieurs études ont été menées avec l'incorporation de divers écrans de rayonnement UV comme le Congo-Rouge, de l'acide folique, de la mélasse, la lignine, l'alginate, la cellulose, la gomme-laque levure, l'acide p-amino avec

des résultats mitigés sur la protection des rayons UV. Néanmoins, les agents encapsulants de biopesticide ont été considérés comme la forme la plus efficace de formulation.

1.6.1. Pluie

Pour que les biopesticides puissent agir longtemps après leur pulvérisation, il faut qu'ils adhèrent aux feuilles et aux plantes le plus longtemps possible. Cependant, il arrive que la pluie entraîne par lessivage une partie des biopesticides déposés sur les feuilles, diminuant ainsi leurs potentiels insecticides. Il est montré qu'une pluie de 3 cm peut réduire de 20% l'efficacité des biopesticides (Sanahuja Georgina et al. 2011). Navon (1993) a aussi montré que la rosée peut diminuer l'efficacité de Bt sur les feuilles. Pour pallier à cet effet néfaste de la pluie, plusieurs études ont été réalisées pour augmenter l'adhérence des biopesticides sur les feuilles. Ainsi, McGuire *et al.* (1994) ont montré que les formulations à base d'amidon peuvent augmenter l'activité insecticide de Bt à cause du fait que ce produit a une propriété adhésive. Aussi, certains composés comme les polysaccharides, les protéines et les glycoprotéines présents dans le corps de certaines cellules comme le *Pseudomonas* peuvent favoriser la propriété adhésive sur les feuilles (Burgess, 1998). Cependant les cellules de Bt ne contiennent pas ces éléments, donc ne possèdent pas cette propriété. D'où l'importance de développer une formulation qui donne cette propriété adhésive aux biopesticides Bt. Ceci est possible soit, par une formulation avec ajout d'additifs comme la mélasse, la gomme xanthane, le méthyl carboxycellulose, soit par une formulation de type microcapsule à base d'amidon comme support.

1.6.2. Température

La température optimale de croissance de Bt est 30°C. Cependant, l'application des produits Bt sur le terrain peut être influencée par la température. En effet, Ignoffo (1992) a montré que seules les valeurs de températures comprises entre 10 et 30°C permettent une bonne activité des bactéries entomopathogènes. Ainsi, les températures extrêmes peuvent causer une inactivation des produits Bt (Paris Margot et al. 2011). Cet impact de la température sur ces

bioinsecticides dépend des régions et des périodes d'application. Contrairement aux régions tropicales où la chaleur élevée peut entraîner la dégradation des formulations (Morris, 1983), au Canada par exemple l'activité des produits Bt est encore possible jusqu'à 0°C (Molloy, 1990). L'étude de la stabilité à la température des formulations Bt obtenues à partir des boues d'épuration et des eaux usées des industries d'amidon a été largement abordée par Brar *et al.* (2007).

1.6.3. Impacts des feuillages

L'activité biologique de Bt est aussi influencée par certains effets négatifs des feuilles. En effet, les études ont montré que l'activité de Bt sur les feuilles ombragées est plus élevée que celle sur des feuilles non ombragées (Beckwith et Stelzer, 1987 ; Bravo Alejandra *et al.* 2013). En effet, l'ombre limite les effets de la lumière et des radiations UV qui réduisent l'activité des cristaux des protéines de Bt. Aussi, la concurrence entre l'action insecticide de Bt et la croissance des plantes (donc augmentation de la surface des feuilles) est une autre problématique dont on doit tenir compte dans la fréquence d'application de Bt aussi bien en agriculture qu'en forêt. De même, diverses études ont montré que certains composés volatils comme des aldéhydes, des cétones, des acides carboxyliques, etc. présents sur les feuilles ont des effets inhibiteurs sur les composants actifs de Bt (Couch and Jurat-Fuentes, 2014; Ferry *et al.*, 2004).

1.6.4. Effets liés à l'applicabilité des biopesticides sur le terrain

Outre les facteurs environnementaux, la formulation de biopesticides Bt tient également compte des problèmes liés à sa commercialisation et à son application sur le terrain (suspension/dispersion, contamination par d'autres microorganismes, potentiel entomotoxique, etc.).

1.6.4.1. Suspension et dispersion

Une bonne pulvérisation des biopesticides exige que le produit formulé présente une structure permettant une bonne suspension et dispersion du mélange. Le nombre de spores et de cristaux de protéines insecticides par gouttelette est un paramètre très important pendant la dispersion (Gasic and Tanovic 2013).

Donc, il est important que les tailles des particules permettent une bonne suspension/dispersion (que le mélange ne décante pas) afin que la calibration des gouttelettes ne varie pas pendant la pulvérisation. Aussi, le contrôle ou la mise en suspension peut se faire parfois par certains additifs ou adjuvants de suspension ou de dispersion. Dans la production industrielle des biopesticides, la stabilité de la dispersion à long terme a une grande importance pour la qualité du produit final (Brar et al. 2006). En effet, la stabilité de la dispersion d'une particule dépendra de l'équilibre entre les forces répulsives et attractives qui existent entre elles lorsqu'elles s'approchent les unes des autres. Il est donc important de prédire l'évolution de la stabilité de la dispersion dans le temps. Ainsi, étant donné que l'interrelation entre les particules peut être déterminée par la mesure du potentiel zêta et de la dispersion, il est nécessaire de faire une étude de prédiction de la dispersion des particules par le potentiel zêta (Hunter Robert, 2013).

1.6.4.2. Préservation contre les contaminations

Pendant leur transport ou l'entreposage, les préparations Bt peuvent être sujettes à des contaminations par des microorganismes. Pour cela, en général les formulations des préparations Bt sont préservées à un pH compris entre 5 et 7 (milieu acide) afin d'empêcher ces contaminations. De même, à ce pH, les cristaux protéiques insecticides sont à l'abri de toute solubilisation protéolytique, car ces cristaux se solubilisent en milieu basique (Dubois *et al.* 1993). En effet, un pH très acide ou très basique peut inactiver les ingrédients actifs du produit Bt (Vachon Vincent et al. 2012 ; Salama and Moris, 1993). Il est aussi démontré qu'un pH optimal de conservation peut augmenter la durée de vie du produit formulé (Khan Qassim et al. 2011). Cette formulation (par exemple granules, briquettes ou microcapsules) peut avoir un certain lien structural pour garder son intégrité pendant un bon moment et prévenir ainsi toutes contaminations (Burges, 1998). Aussi, l'usage des additifs antimicrobiens comme l'acide sorbique et l'acide propionique, le métabisulfite de sodium permet de réaliser un milieu tampon à pH acide (4-6) afin de préserver les biopesticides Bt. Couch et Ignoffo (1981) estiment qu'une

durée de vie de 18 mois est le minimum pratique pour les pesticides microbiens. Cependant, actuellement certains pesticides chimiques commerciaux peuvent avoir une durée de vie minimale de deux ans.

Rhodes (1993) indique donc qu'une durée de vie de quatre ans serait souhaitable pour les biopesticides afin de favoriser leur commercialisation par rapport aux pesticides chimiques.

1.6.4.3. Phagostimulation

Il s'agit d'ajouter aux produits formulés des additifs dont le but est de stimuler ou encourager les insectes à absorber rapidement les préparations formulées. Au laboratoire, il n'est pas facile de mettre les insectes dans les conditions naturelles de compétition dans un petit espace sur lequel le produit formulé est appliqué. En effet, la dose des cristaux ou de spores mangée sur une feuille uniformément traitée doit être proportionnelle à la quantité de feuilles mangées, mais les résultats de mortalité ne sont pas proportionnels (Gnepe et al. 2014).

1.6.5. Les additifs de formulation

D'après ce qui précède, il est nécessaire de compléter l'activité principale des biopesticides (pouvoirs insecticides des composants actifs) par des propriétés secondaires apportées par des additifs (ou adjuvants) de formulation (Tableau 3). Il s'agit d'additifs (1) de conservation des agents antimicrobiens permettant d'accroître la stabilité du produit afin de conserver son intégrité biologique pour une longue durée; (2) améliorant l'adhérence du produit sur les feuilles; (3) de protection contre les radiations UV et la photo dégradation; (4) pour la suspension et la dispersion du produit; (5) émulsifiants et anti-moussants facilitant la manipulation du produit; phagostimulants permettant de donner un goût plus attractif au produit formulé et augmentant ainsi le potentiel entomotoxique. Selon Santé Canada (1992), les adjuvants entrant dans la formulation du produit doivent être évalués et réputés non toxiques aux doses utilisées. Ces adjuvants doivent aussi respecter les réglementations des listes III-A et III-B de USEPA.

Dans tous les cas, les adjuvants de formulation doivent être inertes sans interactions avec les composants actifs. Aussi, le choix ou la sélection des adjuvants doit tenir compte de types de formulation souhaitée, de la rhéologie du milieu formulé et des conditions d'application

Tableau 3: Fonctions et effets de quelques adjuvants de formulation

Fonctions	Effets	Exemples des adjuvants	Références
Agents de protection contre U.V	Protège la formulation contre l'inactivation des composants actifs de Bt par les radiations solaires	Mélasse, acide lignosulfonique de sodium, rouge congo, acide p-amino benzoïque, acide folique, etc.	(Bell et Kanavel, 1978 ; Shapiro et al. 1983 ; Ignoffo et al. 1991)
Agents de suspension	Maintient la formulation en suspension	Sorbitol, sucrose, monophosphate de sodium, metabisulfite de sodium, silicate de sodium, vergum, gomme arabique, polyméthacrylate de sodium, etc.	(En-Xian et al. 2003 ; Styliane et al. 2005)
Phagostimulants	Attire et stimule les insectes à manger suffisamment du produit formulé	Glucose, sucrose, mélasse, fleur de soja, farine de maïs, extrait de levure, pheast TM , etc.	(Montaya et al. 1966 ; McGuirre et al. 1994 ; Farrar et al 1995)
Agents anti-microbiens	Protège la formulation contre les contaminations d'autres microorganismes	Acide propénoïque, acide scorbique, acide citrique, acide lactique, metabisulfite de sodium, etc.	(Grochulski et al. 1995 ; Guillon, 1995)
Adhésifs	Augmente l'adhérence de la formulation aux feuilles, et donc permet à la formulation de résister aux effets de lessivage par la pluie	Mélasse, gomme ghatti, carboxyméthylcellulose, gomme xanthane, sorbitol, etc.	(Jones, 1988 ; Angus, 1959 ; Shasha et al. 1995 ; Roome, 1975)

2. Problématique

La production d'un bouillon fermenté constitue la première étape qui permet l'obtention d'une suspension constituée de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* et de ses sous-produits tels que les protéases, les spores viables, les cristaux protéiques, les protéines végétatives, et les chitinases. Tous ces produits en synergie permettent d'obtenir une entomotoxicité élevée. Il est ainsi nécessaire que le substrat permette une croissance optimale et la synthèse d'endotoxine par Btk. De plus, les procédés qui interviennent en aval de la fermentation devront être optimisés afin de récupérer les matières actives de Btk. La centrifugation est la technique choisie afin de concentrer les composants actifs du bouillon fermenté avant formulation. Les résultats obtenus au laboratoire avec une centrifugation en batch démontrent la fiabilité de cette technique. Toutefois, des volumes importants de suspension (1300L, usine pilote) nécessitent une méthode de concentration plus appropriée pour une durée d'opération faible. Ainsi, une centrifugation en continu (GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477, 15000g x 11800rpm) est utilisée et permet de concentrer les matières actives de Btk provenant d'un bouillon fermenté de volume 1300L en une suspension bactérienne de volume 60L. Cette concentration du volume du bouillon fermenté de 20 fois est nécessaire afin d'atteindre une entomotoxicité de 20000 UI/ μ L équivalent à 30 MIU/ha nécessaire pour traiter 1.5L/ha d'une surface forestière infestée de larves de tordeuse des bourgeons d'épinette. Ce procédé à l'état actuel constitue un frein à la productivité du biopesticide.

De plus, le surnageant issu de la centrifugation n'est pas réutilisé. Cependant, après analyses, il subsiste une concentration élevée en spores viables, cellules totales et cristaux de protéines dans le surnageant (Figure 7) (Ndao et al. 2017). Cette perte de matières actives de Btk dans le surnageant constitue une problématique pour l'obtention d'un potentiel entomotoxique élevé. En outre, les études précédentes ont entrepris d'élever le potentiel entomotoxique du biopesticide par la fortification des substrats non conventionnels de matières résiduelles telles que les boues secondaires de station d'épuration. Toutefois, la présence de matière non biodégradable et complexe, ainsi que la teneur du carbone et d'azote limitée dans ces substrats ne permettaient pas d'atteindre une forte croissance cellulaire de Btk ainsi que la synthèse de cristaux de protéine élevée. Face à ces problèmes spécifiques dans les procédés de production des biopesticides à partir de matières résiduelles, il est important de développer des techniques de coagulation-floculation ainsi que des substrats permettant un bouillon fermenté riche en matières actives de Btk. Ces travaux permettront de comprendre le fonctionnement métabolique

de Btk en présence de divers substrats. Il s'agira alors de réduire le nombre de concentration requis pour atteindre le potentiel entomotoxique du biopesticide requis. Des études basées sur les formulations de Btk à partir des nouveaux substrats constitueront également l'objet de cette étude.

En somme les problématiques relevées sont les suivantes :

- 1) Substrat incomplet pour la prolifération de Btk et la synthèse de ses matières actives
- 2) Pouvoir larvicide faible du bouillon fermenté nécessitant un nombre élevé de centrifugation
- 3) Perte importante de volume du bouillon fermenté de Btk lors de la centrifugation en continu
- 4) Pertes importantes de spores viables et de cristaux protéiques lors de la centrifugation affectant le pouvoir larvicide du biopesticide

3. Hypothèses

Par rapport aux problématiques de cette étude et tenant compte de la revue de la littérature, les hypothèses de recherche suivantes ont été formulées :

a) Les coagulants et floculants rentrent dans beaucoup de stratégies d'élimination de particules ou de composés organiques en station d'épuration. Les charges des coagulants et le poids moléculaire des floculants confèrent à ces derniers la particularité de créer des liaisons entre particules minérales et/ou les particules solides (More et al. 2015). L'association de cette technique en fermentation avec la centrifugation devrait améliorer la récupération des cellules totales, des spores viables, et des cristaux de protéine dans la suspension bactérienne afin d'élever le potentiel entomotoxique du biopesticide à base de Btk.

b) Les milieux semi-synthétique tels que le milieu semi-synthétique à base de soja permettent de produire des biopesticides à forte concentration cellulaire de Btk grâce à la nature de leur nutriments ainsi que la teneur élevée en carbone et azote qu'il renferme (Ghribi et al. 2007 ; Khedher Ben et al. 2011 ; Sundaram et al. 1996). Le supplément de ce type de substrats à différents ratio dans les substrats non conventionnels devrait permettre d'augmenter la concentration des matières actives de Btk, dans le but d'élever le potentiel entomotoxique du biopesticide.

c) L'efficacité d'un adjuvant dans une formulation dépend de sa concentration et de son synergisme avec la rhéologie du milieu de culture selon Brar et al. 2006. Dans cette étude, de nouveaux substrats pour la culture de Btk, seront développés. Ainsi, l'optimisation qualitative et quantitative des différents additifs de formulation en fonction de la viscosité, de la taille des particules, de l'adhésion aux branches d'arbres et à la résistance aux radiations solaires devront permettre de meilleur rendement des applications sur le terrain.

4. Objectif de recherche principal

L'objectif principal de cette recherche est de déterminer les paramètres scientifiques essentiels à l'optimisation de la formulation de biopesticide à base de *Bacillus Thuringiensis var. kurstaki* à partir des substrats d'eaux usées industrielles d'amidon enrichies de milieux semi-synthétiques. Il s'agira également d'optimiser la concentration de la suspension bactérienne nécessaire à l'obtention d'un potentiel entomotoxique important dans la formulation à l'aide d'agents flocculants et/ou de centrifugation. Ainsi, en se basant sur les hypothèses et la synthèse bibliographique, les objectifs spécifiques définis sont :

- a).** Optimiser la fortification des eaux usées d'industrie d'amidon par différents milieux semi-synthétiques et étudier l'apport de ces nutriments afin d'améliorer la concentration des matières actives de Btk
- b).** Évaluer la possibilité d'augmenter la productivité du procédé en réduisant le nombre de centrifugation et assurer un potentiel entomotoxique constant.
- c).** Étudier les techniques de coagulation-floculation, pour récupérer les composants actifs du surnageant obtenu à partir de la centrifugation du bouillon fermenté des eaux usées d'amidon.
- d).** Établir un bilan de masse du procédé
- e).** Etudier l'effet de la fortification des eaux usées d'industries d'amidon par des boues secondaires anaérobies et aérobies issues du traitement des eaux usées d'industrie d'amidon
- f)** Optimiser les concentrations des adjuvants de la formulation issue des eaux usées d'amidon fortifiée de milieu-semi-synthétique en fonction de la viscosité, du lessivage et de la dispersion des particules.

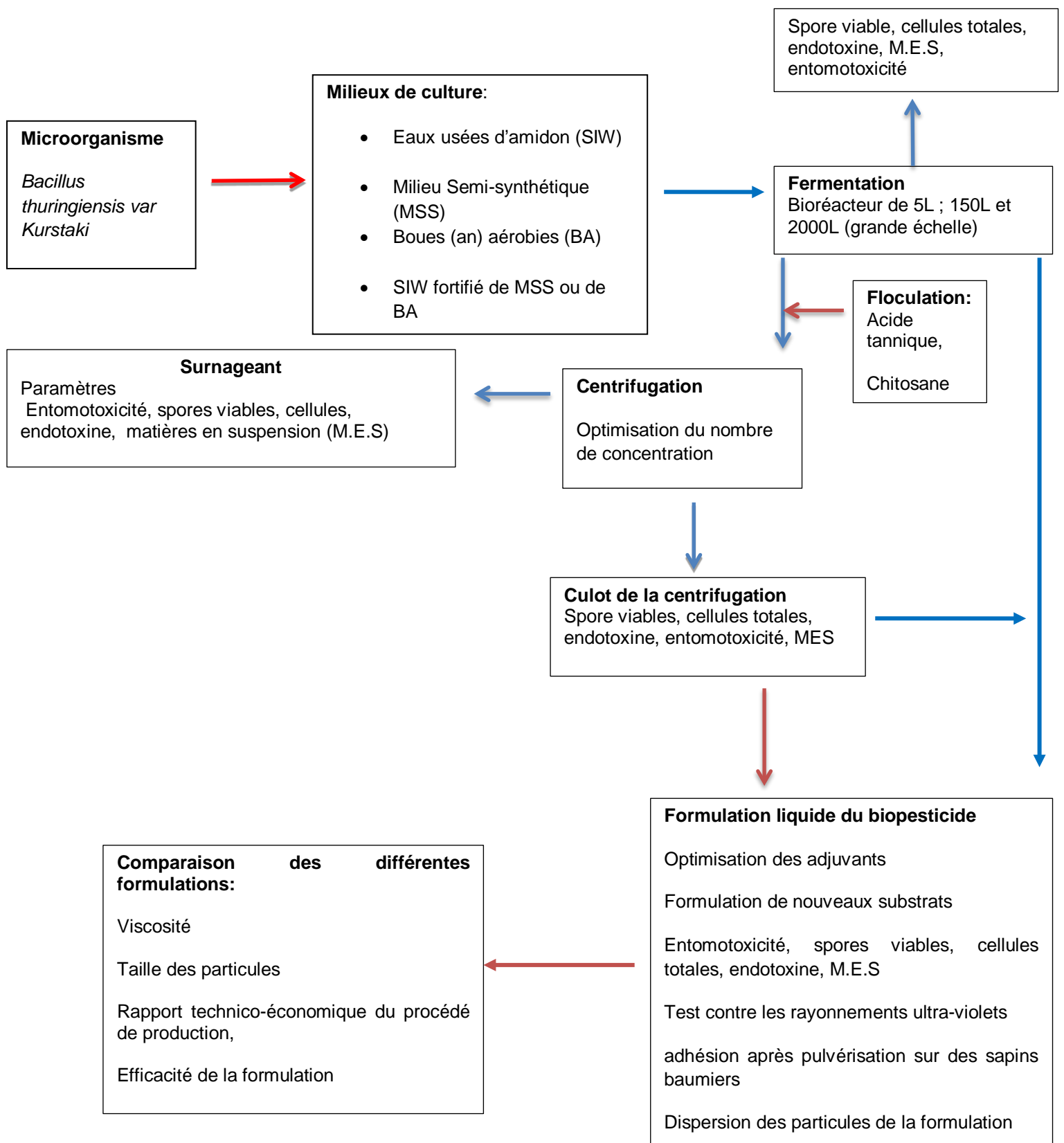
g) Étudier les effets des radiations U.V sur les composants actifs des biopesticides avant et après formulation, tout en déterminant les demi-vies d'entomotoxicité.

5. Originalité de la recherche

L'originalité de cette étude porte sur plusieurs aspects. Le procédé de production de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis var kurstaki* est axé sur un nombre de concentration élevée du bouillon fermenté en vue d'augmenter le potentiel entomotoxique du biopesticide. Le développement d'un substrat optimal à la culture de Btk, par la fortification des milieux non conventionnels, de substrats semi-synthétiques, permettrait d'enrichir le bouillon fermenté de matière active de Btk ainsi que d'augmenter la productivité du procédé. De plus, l'insertion d'une filière de coagulation-floculation comme méthode d'appoint à la récolte des matières actives de Btk est une première. De surcroit, les tests de lessivage de la formulation de Btk à base d'eaux usées industrielles d'amidon, sur des sapins baumiers à condition réelle d'application aérienne n'a pas encore été étudiée. Enfin, au terme de ce projet de recherche, deux formulations à potentiel entomotoxique différent seront prêtes pour la commercialisation.

Plan expérimental:

Le plan expérimental de cette étude est représenté ci-dessous :



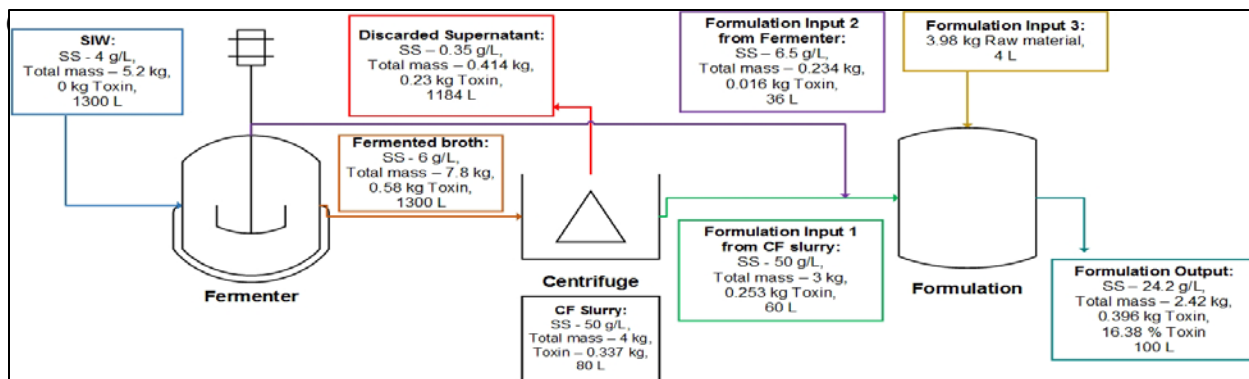


Figure 7: Schéma du procédé de production de biopesticide à base d'eaux usées industrielles d'amidon

6.1. Souche de culture

La souche *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, Btk, sérotype (3a, 3b) est une bactérie, gram positif, aérobic, capable de sporuler durant sa phase stationnaire et de produire en concomitance des cristaux parasporaux. L'activité insecticide est due à l'action des spores viable et des endotoxines (Cry IAb) contenues dans les cristaux parasporaux. Les endotoxines qui sont codées par des gènes cry, ont des activités insecticides contre les espèces de l'ordre des lépidoptères et contre certaines larves de diptères (mouches et moustiques) et de coléoptères (scarabées), (Schnepf *et al.* 1998). La souche Btk a été commandée chez Cederlane laboratories INC (4410 Paletta Court, Bullington, ON, Canada, L7L 5R2) et a été répliquée dans différents flacons et conservée dans un congélateur à - 80°C pour de futures utilisations.

6.2. Différents substrats de culture pour la fermentation de Btk

6.2.1. Eaux usées d'industrie d'amidon

Un des substrats de croissance de Btk est une eau résiduelle provenant d'une industrie d'amidon obtenue d'ADM-Ogilvie (Candiac, Québec, Canada). Les eaux usées d'industrie d'amidon (SIW) ont été échantillonnées et mises dans la chambre froide à 4°C pour éviter qu'elles ne se détériorent après 2 mois de stockage. La composition de ce milieu, analysée par ICP-AES axial Vista, est présentée dans le tableau 4 et le tableau 8.

Tableau 4 : Caractéristiques SIW - Longueur d'onde suggérée et limite de détection estimée pour les minéraux sélectionnés par ICP-AES axial Vista

Minéraux	Longueur d'onde suggérée (nm)	Limite de détection estimée (mg/L)	Concentrations (mg/L)
Al	396.152	0.0013	13
As	193.696	0.0021	21
B	249.678	0.0006	7
Ba	455.403	0.0005	6
Ca	317.933	0.0022	2.890
Cd	214.439	0.0001	< 1
Co	238.892	0.0003	< 3
Cr	267.716	0.00018	5
Cu	324.754	0.0011	11
Fe	238.204	0.00017	100
K	766.491	0.0016	19.500
Mg	279.553	0.00018	5.700
Mn	257.610	0.00004	56.1
Mo	202.032	0.0007	8
Na	588.995	0.0019	33.100
Ni	231.604	0.0007	7
P	177.434	0.003	15.800
Pb	220.353	0.0015	15
S	181.972	0.007	6.100
Sb	217.582	0.003	30
Sc	335.372	0.00008	5.7
Se	196.026	0.005	50

Sn	189.925	0.0018	18
Sr	407.771	0.00017	3
Ti	337.280	0.00011	4
V	292.401	0.0004	4
Zn	206.200	0.0004	37

6.2.2. Milieu Soja

Le milieu soja est un milieu composé de la farine de soja biologique (Moulin aux abenakis, Sainte Claire Qc, Canada). C'est un milieu semi-synthétique, utilisé comme substrat pour la croissance de Btk (Yezza et al. 2006). Dans cette étude, Il est utilisé également afin de fortifier les eaux usées d'amidon à différents pourcentages et comme un contrôle pour comparer les résultats de croissance, de sporulation et de synthèse de cristaux par Btk entre les différents milieux (Tableau 5).

Tableau 5: Composition du milieu Soja

Ingrédients	Concentration g/l composition 100% (contrôle)	Concentration g/L Composition 50%	Concentration g/L Composition 25%	Concentration du milieu SIW fortifié de soja à 25% (sans minéraux) g/L
CaCO ₃	2	1	0,5	-
FeSO ₄	0,04	0,02	0,01	-
glucose	10	5	2,5	2,5
K ₂ HPO ₄	2	1	0,5	-
KH ₂ PO ₄	2	1	0,5	-
MgSO ₄	0,6	0,3	0,15	-
Farine de soja	30	15	7,5	7,5

Amidon	10	5	2,5	2,5
---------------	-----------	----------	------------	------------

6.2.3. Extrait de malt

Le milieu extrait de malt (Oxoid Ltd, basingstake, CM0057) est un milieu composé farine de malt. Elle a été supplémentée au milieu SIW ou utilisé seul en guise de contrôle (tableau 6).

Tableau 6 : Composition du milieu extrait de malt

Ingrédients	Concentration g/l composition 100%	Concentration g/L Composition 50%	Concentration g/L Composition 25%
CaCO₃	2	1	0,5
FeSO₄	0,04	0,02	0,01
glucose	10	5	2,5
K₂HPO₄	2	1	0,5
KH₂PO₄	2	1	0,5
MgSO₄	0,6	0,3	0,15
Farine extrait de malt	30	15	7,5
Amidon	10	5	2,5

6.2.4. Farine de maïs

Le milieu farine de maïs est un milieu composé de farine de maïs (Fleishmann's corn starch canada 100% pure). Ce milieu d'amidon été supplémenté au milieu SIW ou utilisé seul comme contrôle pour la culture de Btk (tableau 7).

Tableau 7 : Composition du milieu amidon de maïs

Ingrédients	Concentration g/l composition 100%	Concentration g/L Composition 50%	Concentration g/L Composition 25%
CaCO ₃	2	1	0,5
FeSO ₄	0,04	0,02	0,01
glucose	10	5	2,5
K ₂ HPO ₄	2	1	0,5
KH ₂ PO ₄	2	1	0,5
MgSO ₄	0,6	0,3	0,15
Farine d'amidon de maïs	30	15	7,5
Amidon	10	5	2,5

6.2.5. Boues anaérobies et aérobies secondaires

Les eaux usées d'amidon sont des milieux riches en DCO et en DBO supérieures à 300mg/L. Les normes exigent un traitement de ces matières résiduelles avant rejet dans les conduites de station municipales d'épuration. Ainsi, les eaux usées d'amidon subissent une digestion en anaérobie, suivie d'une digestion en aérobie. Ces deux traitements génèrent des boues riches en matières organiques (source d'azote organique importante) nommées boues anaérobies secondaires et boues aérobies secondaires. Les caractéristiques de ces milieux sont rapportées dans le tableau 8.

Tableau 8: Caractéristiques physiques et chimiques des substrats

Substrats	SIW	Boues aérobies secondaires	Boues anaérobies secondaires
Carbone organique total (mg/L)	4990	154	135
Azote organique total (mg/L)	460	397	367
Azote ammoniacal (mg-N/L)	20.1	208	395
pH	3.5	5	8.5
Matières en suspension g/L	5	3.4	5.64
Matière en suspension (g/L) Traiter à pH 2	2.1	2.35	2.85
Matière en suspension (g/L) Traiter à pH 7	4.05	2.95	3.6
Matière en suspension (g/L) Traiter à pH 12	2.3	2.85	3.4

6.2.6. Acides aminés

Afin, d'étudier l'effet des acides aminés présents dans le milieu SIW supplémenté de soja à 25%. Les acides aminés (acide aspartique, acide glutamique et glutamate) (L-amino acids, SIGMA-aldrich, Steinheim, Germany) ont été ajoutés après optimisation à une concentration de 0,33g/L dans les milieux SIW (sans soja) fortifié de CaCO₃ 2g/L, FeSO₄ 0,04 g/L, KH₂PO₄ 2g/L, K₂HPO₄ 2g/L, glucose 10g/L, MgSO₄ 0,6g/L et amidon 10g/L. Ces milieux lorsqu'ils sont composés de ces acides aminés seront décrits milieux AA et milieux sans AA, lorsqu'ils ne sont pas supplémentés d'acides aminés. L'addition des acides aminés s'est faite par injection à partir d'une seringue stérilisée munie d'un microfiltre de 0,2 µm. les acides aminés en poudre sont mélangés à de l'eau distillée préalablement stérilisés avant injection et solubilisation dans le milieu de culture.

6.2.7 Analyse des glucides

Les échantillons de bouillon fermenté sont centrifugés à 10000g pendant 10 mn à 4°C. Le surnageant obtenu est filtré à l'aide d'un microfiltre de 0,45 µm (Thermo scientific, USA). L'analyse des carbohydrates a été effectuée en utilisant la chromatographie en phase liquide et la méthode de spectroscopie de masse (LC-MS / MS) (Thermo TSQ Quantum) équipée d'une ionisation par électropulvérisation (ESI) en mode d'ions négatifs. La colonne analytique utilisée était celle de Carbohydrate Zorbax avec des spécifications de 4,6 mm x 150 mm (Agilent sciences de la vie). Le volume d'injection était de 10 µL et le standard interne utilisé était le Glucose-D2. La phase mobile utilisée pour l'analyse des carbohydrates était composée de 75% d'acétonitrile mélangé avec 0,1% de NH₄OH et 25% d'eau mélangée avec 0,1% de NH₄OH (McRae et Monreal 2011).

6.3. Fermentation

6.3.1. Eaux usées d'industries d'amidon (SIW), milieux semi-synthétiques

6.3.1.1. Inoculum

L'inoculum du milieu SIW contrôle, des milieux semi-synthétiques et des milieux SIW supplémentés de milieu semi-synthétique partent d'une boîte de pétri contenant les souches isolées de Btk. Ces souches sontensemencées dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 40ml du milieu SIW contrôle, soya contrôle, farine amidon contrôle, malt contrôle ou SIW supplémenté de ces milieux préalablement stérilisés. La culture se fait à 30°C à pH 7 et à 200rpm pendant 9h. Ce milieu est transféré dans des erlenmeyers de 4L contenant 2L du même milieu de culture. La culture se fait dans les mêmes conditions pendant 9h. Les milieux contenant le glucose, le KH_2PO_4 , le K_2HPO_4 ainsi que le MgSO_4 sont stérilisés séparément du milieu de culture afin d'éviter une précipitation ou la formation du complexe maillard. Ce dernier est composé d'un complexe de melanoidine (glucide lié à des acides aminés) difficilement biodegradable. (Zhang, Xiaolei et al. 2014).

L'impact sur la non fortification de l'inoculum a été étudié lors de la fermentation de Btk à partir d'un milieu SIW supplémenté de soja à 25% (sans ajout de minéraux). En effet, durant la mise à l'échelle, l'inoculum fortifié peut présenter un coût non négligeable. Ainsi, un inoculum de SIW sans fortification a servi à la fermentation de Btk en bioréacteur composé de SIW supplémenté de soja à 25% sans ajout de minéraux (Tableau 5). En effet, le SIW est un milieu riche en minéraux (Tableau 4). Ces derniers sont nécessaires au bon fonctionnement enzymatique des bactéries. Les résultats issus de cette expérience sont comparés à une fermentation de Btk ou l'inoculum et le bioréacteur final sont composés de SIW fortifié à 25% de soja.

6.3.1.2. Fermentation en bioréacteur

Les fermenteurs de 150L disposent de 100L de volume utile (Biogénie, Que., Canada) équipés d'accessoire et d'un système contrôle logique programmable (PLC) pour l'oxygène dissous (DO), pH, l'antimousse, l'agitateur, le taux d'aération et la température. Le logiciel (iFix 3.5, Intellution, USA) permet de contrôler et de fixer les valeurs optimisées et d'intégrer tous les paramètres de PLC. Les bioréacteurs sont stérilisés au préalable avec les milieux de culture. Les mêmes précautions concernant le glucose, le KH_2PO_4 , le K_2HPO_4 ainsi que le MgSO_4 sont prises. Les sondes de pH, et d'oxygène sont calibrées afin de contrôler le pH et l'oxygène dissous lors de la croissance de Btk. l'inoculation se fait à la flamme pour maintenir les

conditions stériles de fermentation à pH 7 et à 30°C. Les échantillons sont prélevés à chaque 3h durant les 12 premières heures de la fermentation et à chaque 6h jusqu'à 48h de la fermentation. À la fin de la fermentation, le pH du bouillon fermenté sera réduit à 4,5 afin d'éviter la solubilisation des protéines par les protéases actives à pH basique (Brar et al. 2006). Des analyses portant sur la concentration des cellules totales, spores viables, cristaux protéiques, viscosité, le sucre réducteur et protéases seront déterminées sur les différents échantillons prélevés. L'entomotoxicité sera déterminée quant à elle sur l'échantillon final après formulation.

6.3.2. Boues aérobies et anaérobies

6.3.2.1. Fermentation en bioréacteur de 5L

Les eaux usées d'amidon (SIW), les boues anaérobies et aérobies ont été utilisées comme substrat de culture pour Btk à partir de bioréacteurs de 5L. Le volume de l'inoculum correspond à 2% (v/v) du volume utile du bioréacteur final. Les bioréacteurs de 5L ont un volume utile de 3L. Une souche pure de Btk isolée à partir d'une gélose TSA (Tryptic Soja Agar) sert à inoculer les inocula constitués d'erenmeyer de 250 mL contenant 60 mL de SIW, 60 mL de boues anaérobies secondaires et 60 mL de boues aérobies secondaires. La fermentation des inocula se déroule à pH 7, à une température de 30°C, une agitation de 200 rpm pendant 9h. Au terme de cette culture, les inocula sont transférés dans des bioréacteurs de 5 L préalablement stérilisés et connectés au système de contrôle de l'aération, de l'agitation, de l'antimousse, de la base (NaOH), de l'acide (H₂SO₄) et des sondes de température. Une fermentation, dans les mêmes conditions opératoires que l'inoculum, sera réalisée pendant 48h. À la fin de la fermentation, le pH du bouillon fermenté sera réduit à 4,5 afin d'éviter la solubilisation des protéines par les protéases actives à pH basique. Des analyses portant sur la concentration des cellules totales, spores viables, cristaux protéiques, seront déterminées sur les différents échantillons prélevés.

6.3.2.2. Traitement à différents pH du SIW, des boues aérobies et anaérobies secondaires

Les substrats SIW, boues aérobies et anaérobies sont des milieux complexes constitués de carbone complexe. Ces carbones organiques comportent des matières biodégradables complexes qui nécessitent souvent le traitement à pH basique (NaOH) ou à pH acide (acide sulfurique) pour les rendre accessible sous forme de carbone simple (Vu et al. 2008 ; Yezza et

al 2006). Ainsi, les milieux étudiés sont traités à pH 2, 7 et 12 puis stérilisés à une température de 121°C, une pression de 15 psi pendant 15 mn. Les matières en suspensions des échantillons traités ont montré que le traitement à pH 2 entraînait une solubilisation importante sur l'ensemble des substrats (Tableau 8). Les échantillons traités (pH 2 et 7) sont analysés par LC-MS-MS Thermo TSQ Quantum (Tableau 9).

La fermentation des substrats traités à pH 2 s'est déroulée dans des bioréacteurs de 5 L dans les mêmes conditions opératoires que celles désignées dans la fermentation des boues sans traitement. À la fin de la fermentation, le pH du bouillon fermenté sera réduit à 4,5 afin d'éviter la solubilisation des protéines par les protéases actives à pH basique. Les analyses portant sur les cellules totales, spores viables et endotoxines ont été effectuées et comparées aux résultats issus des substrats non traités.

Tableau 9: Détermination des glucides par LC-MS-MS après traitement des substrats à différent pH

Glucides	glucose mg/L	Fructose mg/L	Lactose mg/L	Sucrose mg/L	Galactose mg/L	Xylose mg/L
Anaérobie pH 2	390	<4	<4	<4	<4	5
anaérobie pH 7	<4	<4	<4	<4	<4	<4
Aérobie pH 2	12	<20	<20	<20	<20	11
aérobie pH 7	<4	<4	<4	<4	<4	<4
SIW pH 2	380	310	<20	<20	150	320
SIW pH 7	170	320	<20	20	110	140

6.3.2.3. Fortification à différentes concentrations des milieux boues aérobies, anaérobies et SIW dans le milieu SIW

Les substrats issus de résidus d'industrie alimentaire ou de station d'épurations sont caractérisés par la présence de nutriments sous forme de biosolides ou matières en suspension (Yezza et al. 2006). Ces matières en suspension regroupent le carbone organique dissous (fraction du surnageant durant la centrifugation), le carbone organique particulaire (fraction du culot durant la centrifugation) mais également l'azote organique dissous, particulaire ainsi que l'azote ammoniacal. L'analyse de l'azote et du carbone total montrent que ces derniers sont retrouvés à des proportions équivalentes dans les fractions particulaires et dissoutes. Ainsi, la concentration par centrifugation des substrats provenant des boues aérobies, anaérobies et SIW a été effectuée respectivement à 15g/L et 30g/L puis supplémentée dans le substrat SIW. En effet, le milieu SIW représente le substrat le plus riche en nutriments (tableau 8). Il a ainsi servi de substrat fortifié.

La fermentation des substrats SIW supplémentés à 15 g/L et 30g/L de SIW, boues anaérobies et aérobies secondaires (traités à pH 2) a été effectuée dans des bioréacteurs de 5 L. Les inocula et les bioréacteurs comportaient les mêmes concentrations de substrat. Les conditions opératoires de fermentations étaient identiques à la partie 1 de la méthodologie. À la fin de la fermentation, le pH du bouillon fermenté sera réduit à 4,5 afin d'éviter la solubilisation des protéines par les protéases actives à pH basique. Les analyses portant sur les cellules totales, les spores viables et la concentration des endotoxines ont été déterminées sur les échantillons de fermentation à chaque 3h durant les 12 premières heures de la fermentation et à chaque 6 h jusqu'à 48h de fermentation.

6.4. Flocculation

Les expérimentations pour la récupération des matières actives de Btk du surnageant se sont déroulées dans des jars test standard (Nouha et al. 2016) comportant des béciers de 1L de volume. Chaque bécier comportait 500ml du bouillon fermenté. Le 1^{er} coagulant-floculant testé est le chitosane (Sigma aldrich 448869-250G). Celui-ci est d'abord solubilisé dans une solution d'acide acétique à 0.1M. Des volumes de chitosane en fonction de la concentration finale de chitosane (0, 50, 100, 150, 200, 400,700 mg\L) sont rajoutés directement dans le bécier contenant le bouillon fermenté. Ensuite, le pH du milieu est fixé à 7 ou 5 par ajout de solution acide chlorhydrique (0.1M) ou d'hydroxyde de sodium (0.1M) en fonction de l'expérience

effectuée. Puis, une agitation vigoureuse à 200rpm est effectuée pendant 2 mn pour bien répartir la solution de chitosane dans le bouillon fermenté à traiter. Il s'en suit, une agitation moins vigoureuse de 30rpm pendant 20 mn avant que la solution ne soit laissée décanter pendant 20 mn.

L'expérience avec le flocculant, acide tannique (Fisher scientific A310-500) prend place après solubilisation et agitation à 200rpm pendant 5 mn du chitosane dans un bécher contenant 500ml du bouillon fermenté. Les volumes d'acide tannique correspondant aux concentrations voulues (150, 300, 600, 900mg\L) sont ajoutés dans la solution à traiter. Le pH est ensuite relevé (NaOH 0.1M) si nécessaire ou réduit (HCl 0.1M) en fonction des expériences en milieu acide (pH 5) ou neutre (pH 7). Puis, une agitation de 80rpm pendant 30 mn est effectuée avant qu'une décantation de 20mn soit observée.

Avant les étapes de décantation, des échantillons provenant des expériences réalisées ci-dessus sont soumises également à la centrifugation (Sorvall RC5c plus superspeed) à différents rpm (9000, 10000, 15000,20000rpm).

Les analyses suivantes portant sur le surnageant après décantation sont réalisées, cellules totales (CFU\ml), spores viables (CFU\ml), turbidité (NTU), taille des particules (μm) et protéases (U\ml).

L'analyse des endotoxines ($\mu\text{g}\text{ml}$) après décantation étaient réalisées sur la fraction du décantât.

Avant décantation, les échantillons portés à la centrifugation ont été analysés (fraction surnageant sauf endotoxine) en termes de turbidité, cellules, spores viables, protéase et endotoxine (culot).

Les contrôles des différentes expériences sont caractérisés par l'absence de coagulant-flocculant et des mêmes conditions opératoires à savoir pH similaire, agitation, durée de décantation et de centrifugation.

6.4.1. Taille des particules

Le matériel utilisé afin de déterminer la taille des particules est une machine Horiba (laser scattering particle size distribution analyser LA-950). Dès le démarrage de la machine, l'appareil mesure la transmittance du liquide à analyser. Puis il active automatiquement la vitesse de la circulation, la vitesse de l'agitation de même que la forme de la distribution. Ensuite, il faut introduire la matière à analyser (sous forme liquide) dans l'espace réservée à cet effet. Ainsi, grâce à la base de données de types de matériaux préenregistrés, la machine pourra situer

l'échantillon à analyser. De ce fait, après l'ajout de l'échantillon, il faudra choisir la nature de l'index pour laquelle l'échantillon devra être analysé. Dans le cas des eaux usées d'amidon, l'index choisi est le liposome.

6.4.2. Potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert en raison des ions qui l'entourent lorsqu'elle est en solution, ce qui représente un bon indicateur des interactions entre particules, et donc de la stabilité des colloïdes, telles que les émulsions (selon la théorie développée DLVO par Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek, en 1940, qui propose que la stabilité des particules en suspension dépend du potentiel total d'interaction).

La mesure du potentiel zêta permet d'étudier le comportement des émulsions et des suspensions (stabilité, glaçage, coalescence, agglutination) et ainsi de résoudre certains problèmes de formulation. Le potentiel zêta peut être positif (cationique) ou anionique négatif (Nouha et al. 2016). Le Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000 (CAD instrumentation France) a été utilisé pour mesurer le potentiel zêta des particules colloïdales en suspension dans un liquide en déterminant le taux de particules en mouvement, suivant un champ électrique connu.

L'échantillon à mesurer est placé dans la chambre d'électrophorèse contenant deux compartiments d'électrodes et une chambre de connexions. Une tension est appliquée entre les deux électrodes, chacune située sur les deux côtés du compartiment. La tension appliquée produit un champ électrique uniforme dans la chambre de connexion et les particules chargées se déplacent vers l'autre électrode. Chargées positivement, les particules migrent vers la cathode (électrode négative) et vice-versa. La vitesse de ces particules est directement proportionnelle à la charge des particules.

Les échantillons mélangés et dilués ont été introduits dans le Zêta-photomètre (vannes ouvertes) au moyen d'une seringue. L'analyse a été faite immédiatement après le mélange pour éviter les bulles dans la cellule. Les vannes doivent être fermées pour stabiliser l'échantillon avant d'appliquer un champ électrique et de l'observer sur l'écran.

6.4.3. Turbidité

La turbidité du bouillon fermenté est liée à la présence ou l'absence de la matière colloïdale représentée par les particules du SIW, des cellules totales, des spores viables et endotoxine de Btk. La turbidité est mesurée en utilisant un turbidimètre Macro 100 (Scientific Inc., FL, US) qui permet des mesures de 0 à 1000 NTU à une absorbance de 720nm.

6.5. Cellules totales et spores viables

Les cellules totales et les spores viables ont été déterminées par comptage de colonies sur milieu TSA (Tryptic Soya Agar). Pour tous les comptes, la moyenne des duplicatas a été prise en compte. Pour le comptage, les boîtes de Pétri comprises entre 30-300 ont été prises en compte. Les résultats ont été exprimés comme colonie formant colonie par ml (CFU/ml). Les dilutions successives des échantillons ont été effectuées jusqu'à 10^{-6} dans une solution de NaCl 0,8 (% p/v). Un volume de 0,1 ml des trois dernières dilutions est étalé en duplicata sur le milieu TSA. Les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve Imperial II incubateur à 30°C pendant 24h.

6.6. Endotoxine

La concentration de delta endotoxine a été déterminée en se basant sur la solubilisation de protéines de cristal d'insecticide dans des conditions alcalines. 1 ml de chaque échantillon collecté à la fin de la fermentation (48h) a été centrifugé à 10 000g pendant 10mn à 4°C. Le culot contenant le mélange des spores, des cristaux de protéines, des débris de cellules ont été utilisés afin d'estimer la concentration des cristaux de protéines d'insecticide soluble (delta-endotoxine) en milieu alcalin. Les culots ont été lavés 3 fois avec 1 ml de 0,14 M NaCl-0.01 Triton X-100. Le lavage élimine les protéines solubles et les protéases qui pourraient affecter l'intégrité des cristaux de protéines. Les cristaux de protéines du culot ont été dissous avec 0,05N NaOH pendant 3 heures à 30°C. La suspension a été centrifugée à 10 000g pendant 10mn à 4°C et le culot contenant les spores et les débris de cellules ont été écartés. Le surnageant contenant les cristaux de protéine d'insecticide a été utilisé afin de déterminer la

concentration de delta-endotoxine par la méthode de Bradford en utilisant du sérum albumine bovin comme standard de protéine.

6.7. Activité protéolytique

L'activité protéolytique a été mesurée selon la méthode modifiée de Kunitz, 1947. Une partie du surnageant (en triplicata) a été diluée avec un tampon borate de pH 8 ± 0.1 . L'activité protéolytique fut déterminée en incubant le surnageant de 1 mL avec une solution enzymatique contenant 5 mL de caséine pendant 10 mn à 37°C à l'aide d'un bain marie. La réaction s'est achevée par l'addition de 5mL d'acide trichloracétique. Ce mélange a été incubé pendant 30mn afin de précipiter la caséine non hydrolysée. Un contrôle a également été préparé avec de la caséine non hydrolysée. A la fin de la période d'incubation, les échantillons et les solutions contrôles sont filtrés à travers un papier filter Whatman 934-AH. L'absorbance des filtrats a été mesurée à 275nm. Une unité d'activité protéolytique fut définie comme équivalent à la quantité de préparation d'enzyme requis pour libérer 1 μmol (181 μg) par minute de tyrosine provenant de la caséine à pH 8 à une température de 37°C .

6.8. Formulation

Tableau 10 : Concentration de différents adjuvants, viscosité, taille des particules, cellules totales, spores viables, endotoxine présentes dans les Formulations SIW, SIW fortifié de soja, F2d, Foray 76B et Btk sander's

Formulation →	SIW	SIW fortifié de soja (25%)	F2d	Foray 76B	Btk sander's
Adjuvants/suspension ↓					
Creme (L)	60	7	6	-	-
Acide propionique (L)	0.07	0.0077	0.01	-	-
Sorbitol (Kg)	1	0.11	0.13	-	-
Acide Sorbique (Kg)	0.01	0.0011	0.13	-	-
Carboxymethylcellulose (Kg)	0.15	0.0055	0.018	-	-

Xantham gum (Kg)	0.2	0.0055	0.018	-	-
Mélasses (Kg)	0.3	0.0165	0.03	-	-
Potassium silicate (Kg)	0.25	0.0165	0.03	-	-
Sodium acétate (Kg)	1.7	0.0495	0.0525	-	-
Acide Acétique (L)	0.25	0.0275	0.0525	-	-
Bouillon fermenté (L)	36	4	15	-	-
Cellules totales (CFU/mL)	3.19 x 10 ⁹ ± 0.2552	8.3 x 10 ⁹ ± 0.664	3.05 x 10 ⁹ ± 0.244	4.2 x 10 ⁹ ± 0.336	2.45 x 10 ⁹ ± 0.196
Spores viables (CFU/mL)	2.95 x 10 ⁹ ± 0.236	7.8 x 10 ⁹ ± 0.624	2.85 x 10 ⁹ ± 0.228	3.7 x 10 ⁹ ± 0.296	2.35 x 10 ⁹ ± 0.188
Endotoxines (µg/mL)	2951 ± 147.55	7442 ± 372.1	2850 ± 142.5	3100 ± 155	2500 ± 125
Viscosité cP ou mPas	185 ± 9.25	137 ± 6.85	130 ± 6.5	135 ± 6.75	240 ± 12
Taille des particules D 50: µm	1.58 ± 0.1264	1.67 ± 0.1336	2.06 ± 0.1648	1.28 ± 0.1024	1.44 ± 0.1152
Potentiel zeta (mV)	-30 ±2.7	-35 ± 3.15	-35 ± 3.15	-30 ± 2.7	-35 ± 3.15

La formulation désigne l'étape en aval du procédé de production du biopesticide qui a pour but la stabilité, l'intégrité et l'efficacité du produit dans le temps et dans l'espace (Ndao et al. 2017). La formulation composée d'un ratio de la crème et du bouillon fermenté assure une entomotoxicité et des propriétés physiques optimales au biopesticide. Elle est complétée de différents adjuvants. Ces derniers doivent être respectueux de l'environnement, inerte vis-à-vis des matières actives (spores viables, endotoxines, cellules totales) tout en assurant leur rôle. Ainsi, la formulation est composée de phagostimulant tel que la mélasse, d'agent de

suspension : sorbitol, potassium silicate, agent de protection contre les radiations ultra-violet : mélasse, agent anti corrosion : potassium silicate, agent antimicrobien ou anticontamination : acide propénoïque, acide ascorbique, agents adhésifs : xantham ghum, carboxyméthylcellulose, mélasse, agent tampon : sodium acétate et acétique acétate (Brar et al. 2006). Les concentrations de chacun des agents dépendent des caractéristiques du substrat à savoir les matières en suspension, taille des particules, viscosité. Ainsi, formulations commerciales (Foray 76B, Btk sander's) ainsi que les formulations du milieu SIW, SIW fortifié de soja à 25% et SIW fortifié de soja à 25% dilué (F2d) sont représentées dans le tableau 10.

6.8.1. Centrifugation en continu

La centrifugation est décrite comme étant la méthode la plus efficace et la moins coûteuse parmi les techniques de concentration de la matière en suspension de Btk (Brar et al. 2006). Elle est constituée de deux phases: d'un culot ou d'une crème selon leur teneur en humidité et d'un surnageant. Lorsque la centrifugation du bouillon fermenté de Btk est réalisé en batch (par séquence), le concentrât obtenu est un culot. Celui-ci est riche en matière en suspension (spores viable, endotoxine et cellules totales) et en matière soluble (zwittermicine, vips et protéase) retrouvée dans le surnageant. Alors que la centrifugation du bouillon fermenté réalisée en continu permet d'obtenir une crème contenant les matières actives de Btk. La concentration de ces matières actives, par centrifugation, dans la crème est primordiale car le traitement en forêt est de 1.5L biopesticide/ha (Bauce Eric et al. 2004). Il est donc essentiel que la formulation soit concentrée en spores viables et cristaux protéiques.

Les bouillons fermentés du milieu SIW (2000L : 1300L volume utile) et du milieu SIW supplémenté de Soja (150L : 100L volume utile) ont subi une centrifugation en continu (GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477, 15000g x 11800rpm). La centrifugation de 1300L de bouillon fermenté de SIW donne une crème (concentrât : culot ou suspension) de 60L tandis que la centrifugation du bouillon fermenté de 100L donne une crème de 7L. Les paramètres de la centrifugation étaient pour le volume de 100L:

Temps de décharge : 2.2mn

Vitesse d'alimentation : 5L/mn

Vitesse de centrifugation : 15000g

Back pressure 8.5 psi

Alors que pour un volume de 2000L, les paramètres optimisés furent de:

Temps de décharge : 2.5mn

Vitesse d'alimentation : 10L/mn

Vitesse de centrifugation : 15000g

Back pressure : 8.5psi

Avant centrifugation, un volume de 4 L et 36L est retiré respectivement du bouillon fermenté de 100 et 1300L de volume en prévision des formulations qui sont composées de bouillon fermenté, de crème et différents adjuvants (Tableau 10). Le volume final de la formulation du SIW est de 96L alors que celui du SIW fortifié de soja est de 11L.

Une formulation diluée issue du milieu SIW fortifié de soja (F2d) a également été étudiée. Dans cette fermentation, un volume de 15 L a été retiré du bouillon fermenté SIW fortifié de soja issu du bioréacteur de 100L, avant centrifugation. La suspension obtenue après centrifugation était de 6L. Ce volume a été mélangé avec les 15L du bouillon fermenté et des adjuvants (Tableau 10) pour un volume final de 21 L. Ainsi, le bouillon fermenté et la crème sont analysés en termes de cellules totales, spores viables, endotoxine, matières en suspension.

6.8.2. Entomotoxicité

La diète MacMorran utilisée pour l'élevage des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) provient du Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada (RNC) situé à Sault-Ste-Marie (Ontario).

Le potentiel entomotoxique des biopesticides est évalué par des bioessais sur les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) du stade 3 selon la méthode d'incorporation dans la diète de Dulmage *et al.* (1971). Les formulations Foray 76B et Btk sander's sont utilisées comme contrôle pour l'entomotoxicité des TBE.

Les échantillons de formulation (SIW, SIW fortifié de soja, F2d, Foray 76B, et BTK sander's) à tester sont dilués suivant une série de dilutions. Les trois dernières dilutions sont utilisées pour la détermination de l'entomotoxicité. Pour ce faire, 1,5 ml de ces échantillons dilués sont mis dans 30 ml de diète stérile contenant 1,5% d'agar stérile (p/v) répartis dans 20 tubes. Cette application réplique les conditions opératoires en forêt où 1.5L est épandu dans 1 hectare de terrain infesté par les larves de tordeuse de bourgeon d'épinette (Dang vu et al. 2009).

Après avoir bien agité, 1 ml du mélange est déposé dans des tubes de verres de 15 x 45 mm préalablement stérilisés à l'autoclave et dont les bouchons de plastique sont finement troués et stérilisés aux rayons ultra-violets. Un groupe de 20 tubes est utilisé pour chaque dilution. Un groupe de 25 tubes est utilisé pour le blanc contenant 1 ml de diète seule, un second groupe de 25 tubes est utilisé pour un contrôle négatif dont les tubes contiennent 1 ml du milieu synthétique stérile, un troisième groupe de 25 tubes est utilisé comme contrôle, contenant 1 ml de bouillon fermenté (Yezza et al. 2006). Le Foray 76B est ajouté à un volume de 1,5 ml dans la diète (30 ml).

Sur une surface propre et proche d'une flamme pour éviter la contamination par des moisissures, une larve est placée dans chaque tube avec un pinceau propre et très fin. Les tubes sont placés à la température ambiante de la pièce et le nombre de morts est compté après 9 jours d'élevage. L'entomotoxicité est rapportée en pourcentage et en UI/ μ l respectivement selon un calcul présenté sur le protocole exposé par Barnabé et al.2009.

Entomotoxicité (UI/ μ l) =

$$\frac{\left(\frac{\%(\text{mortalité échantillon } 10^{-3})}{\%(\text{mortalité standard } 10^{-3})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortalité échantillon } 10^{-4})}{\%(\text{mortalité standard } 10^{-4})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortalité échantillon } 10^{-5})}{\%(\text{mortalité standard } 10^{-5})}\right)}{3} \times 19950$$

6.8.3. Dispersion

Les formulations liquides de Btk sont souvent entreposées avant utilisation dans des entrepôts ou lors de l'épandage aérien. Il est important que les particules demeurent uniformément réparties dans la solution pendant l'entreposage. En effet, une bonne pulvérisation des biopesticides exige que le produit formulé présente une structure permettant une bonne suspension et dispersion du mélange. Le nombre de spores et de cristaux de protéines insecticides par gouttelette est un paramètre très important pendant la dispersion.

En effet, si l'insecte ingère une gouttelette de dose non létale, il peut arrêter de manger pendant plusieurs jours mais survivra et pourra continuer à faire des dégâts (Smimoff et Valéro, 1983). Il est important que les particules demeurent uniformément réparties dans la solution pendant l'entreposage.

Le sorbitol est souvent utilisé dans l'industrie alimentaire et dans certains biopesticides pour conférer des propriétés dispersantes et de suspensions aux formulations (Smimoff and Juneau 1982; Petersen et al. 2004). En fonction du substrat et de la concentration des matières en suspension, l'optimisation de la concentration du sorbitol est étudiée. Ainsi, le plan expérimental de cette mesure s'effectue en prélevant 50mL de la formulation étudiée avant de la suspendre dans 100mL d'eau distillée. Ce mélange est soumis à une décantation de 30mn. Au terme de laquelle, la turbidité du surnageant, les solides totaux et les matières décantées sont mesurés. Le pourcentage de suspension des formulations SIW, SIW sans ajout de sorbitol (C.SIW), SIW fortifié de soja, SIW fortifié de soja sans sorbitol (C.SIW+soja), Foray 76B et F2d est déterminé comme suit:

$$\frac{\text{Turbidité (NTU)}}{\text{solides totaux } \left(\frac{g}{L}\right) - \text{solides décantés } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

6.8.4. Lessivage

Le test de lessivage se déroule dans les conditions opératoires de l'épandage en forêt où 1.5L de formulation est appliqué sur un hectare. Cette surface à traiter équivaut à 0.15ml par mètre carré (m²). La superficie au sol d'un jeune sapin baumier équivaut environ à un m². Ainsi 0.15ml de nos formulations (SIW, SIW fortifié de soja, F2d) devrait suffire à traiter un jeune sapin baumier. La formulation contrôle est constituée des adjuvants sans l'agent actif Btk (bouillon ou crème). Les différentes formulations seront appliquées aux sapins puis 5 jours suivant l'application, un arrosage correspondant à 3cm de pluie au sol sera appliqué, ce qui représente 300ml soit une forte pluie de 30mm.

L'évaluation de l'adhésivité sera faite en imprimant les aiguilles des sapins baumiers sur une gélose TSA à différentes périodes temps (t=0, 1, 24, 48, 72h, 5 jours, 6 jours, 7 jours). Le nombre de cellules totales résiduelles permettra de déterminer l'adhésivité de la formulation.

6.8.5. Test radiation ultraviolet

Les tests de radiation Ultraviolet sont déterminés en fonction d'une source d'émission spécifique d'ultra-violet (Transilluminator, UVP®, San Gabriel, CA, USA) dont les spectres d'émission maximale sont de 366nm (UV-A) et de 312 nm (UV-B). Ces spectres de radiations sont considérés comme létaux aux spores et inactives les cristaux protéiques. En effet, plusieurs études ont mentionné le caractère léthal des radiations UV-B qui affectent le matériel génétique des spores viables. Alors que plusieurs auteurs mentionnent l'implication des radiations UV dans l'inactivité des cristaux protéiques. Les cristaux protéiques s'adsorbent sur des chromophores (jusqu'à présent non caractérisés) provenant du bouillon fermenté. Ces chromophores absorbent la lumière à 300-380nm, et passent leur état excité aux molécules d'oxygènes qui se convertissent en radicaux libres, très réactifs. Ces radicaux attaqueraient les chaînes de tryptophane contenues dans les endotoxines, affectant l'intégrité de ces protéines et leur inactivation. Hadapad et al. 2009 proposerait ainsi l'application d'agent réducteur dans les formulations de Btk afin protéger les protéines des cristaux des radicaux libres d'oxygène.

Le dispositif expérimental est réalisé comme suit : une boîte cubique recouverte de miroir (afin de réfléchir les rayons U.V) sur ces 6 surfaces contient les vials (flacon de petite taille contenant 1 ml des formulations) qui sont disposées sur une étale recouverte d'aluminium se situant à 20cm de la lampe U.V (voir figure 1). Des échantillons de bouillon fermenté (SIW et SIW fortifié de soja) et des formulations (SIW, SIW fortifié de soja, F2d, Foray 76B et Btk sander's) sont retirés à chaque 0, 5, 10, 20, 30,45, 90 et 300h. Ces échantillons permettront de déterminer le temps d'exposition pour réduire de moitié l'entomotoxicité ($Tx_{0,5}$) des différents échantillons étudiés (Brar et al. 2005).

6.8.6. Viscosité

Une viscosité optimale de la formulation permettra une taille des gouttelettes importantes de la formulation ainsi qu'un épandage efficace. Elle est mesurée à l'aide du « Brookefield DVII pro » qui est un viscosimètre équipé d'un logiciel Rheocalc 32, SC-34 broche (petit adaptateur pour échantillon). Le port de la cuvette pour échantillon est utilisé pour mesurer la viscosité (Gnepe et al. 2014).

7. Résultats et discussion

7.1. Effet des milieux semi-synthétiques supplémentés au SIW sur la croissance, la sporulation, la synthèse d'endotoxine de Btk et l'entomotoxicité du biopesticide.

Les résultats de la croissance et de la sporulation à partir de différents milieux semi-synthétique, alternatif (SIW) ou mixe (SIW fortifié) ont permis de montrer la capacité à croître de Btk dans différents substrats. Sa cinétique de croissance et sa capacité à synthétiser des métabolites était directement relié au type de substrat étudié (Perani et Bishop 1999). Des milieux comportant des sources d'azote organique ont été privilégiés aux sources d'azotes inorganiques (ammonium sulfate, sodium nitrate). Ces derniers supportent moins la croissance cellulaire, la sporulation, la synthèse d'endotoxine par Bt (Devidas et al. 2014). La farine de soja est un milieu riche en protéine et glucide comparativement aux autres milieux extrait de malt, farine de maïs et SIW pauvre en azote et riche en carbone organique dissous (Vu et al. 2009 ; Zouari and Jaoua, 1999). La teneur en azote faible du SIW et la nature d'azote inorganique présente dans ce milieu entraîne une croissance de Btk limitée et une sporulation hâtive (Liu and Tzeng 2000; Ndao et al. 2017). Alors que les milieux soja contrôle montrent une croissance cellulaire et une sporulation plus importante. En effet, pour atteindre une forte croissance cellulaire et une bonne sporulation, les sucres simples tels que le glucose et les protéines (nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques et des membranes de spores) sous formes organiques sont nécessaires à une concentration significative (milieu soja) au début de la fermentation et pendant la sporulation de Btk (Setlow and Konberg, 1970). En effet, la croissance cellulaire et la formation des spores sont des phénomènes qui requièrent de l'énergie sous forme ATP, provenant du métabolisme du glucose à travers le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Devidas et al. 2014 a permis une meilleure cinétique de croissance d'une souche de Bt, une accumulation de biomasse et la sporulation de celle-ci en utilisant un milieu de pois de pangole riche en protéine et en glucide comparable au milieu soja. Lorsque les milieux semi-synthétiques sont supplémentés à différentes concentrations au milieu SIW, les milieux SIW supplémentés de milieu soja présente de meilleures croissances cellulaires et de sporulation. Ces résultats sont confirmés par la concentration et la consommation des sucres réducteurs entre 0h et 48h par LC-MS-MS (Tableau 11). Ces résultats témoignent de la forte concentration en carbone dans le milieu SIW fortifié de soja à 25% comparativement au milieu SIW. Ainsi que la préférence de Btk pour le sucrose et le glucose. Alors que le Xylose qui est un glucide à 5 carbones ne peut être métabolisé par Btk

(Mazimira et al.2012). De plus, le déficit d'azote total qui est de 0.45g/L dans le milieu SIW est corrigé par la fortification du milieu soja à 25% ou l'azote total est de 14.4g/L. Cette concentration en azote permet une synthèse cellulaire importante rendue possible par la disponibilité de l'ATP provenant de la métabolisation des glucides dans le cycle de Krebs (Devidas et al. 2014) (Figure 8). Le milieu SIW supplémenté de 25% soja présente les meilleures valeurs de croissance cellulaire et de sporulation comparativement au milieu 50% et 100%. Ces deux derniers milieux comptent une concentration en nutriments très élevée. Ceci a pour conséquence de limiter la croissance cellulaire à cause d'un faible transfert d'oxygène ainsi que l'inhibition par le substrat des enzymes nécessaire au métabolisme cellulaire. (Vidyarthi et al.,2002).

Egalement, la fermentation à partir de l'inoculum non fortifié du milieu SIW fortifié de soja à 25% (sans ajouts de minéraux) présentait des résultats de croissance cellulaire, de sporulation et de synthèse d'endotoxine similaire au milieu à inoculum fortifié de soja à 25%. En effet, le SIW est un milieu qui permet une bonne pré-culture sans phase de latence car il contient les nutriments et surtout des minéraux à fortes concentrations qui ne nécessitent pas un supplément provenant du milieu soja.

La synthèse de delta endotoxine dans les milieux SIW supplémentés de soja montrent une forte synthèse de delta endotoxine comparativement au milieu SIW contrôle. Les cristaux protéiques sont composée de 95% de protéine et 5% de carbohydrate (Kheshavarzi et al., 2005), la synthèse de ces derniers nécessite un besoin en azote organique et en carbone, conditions retrouvées dans le milieu fortifié de soja. Une disponibilité importante d'ATP durant la sporulation, affecte positivement la production de cristaux protéique par Btk. Mazmira et al. 2012 a montré que la présence de 8g/L de glucose permettrait de déclencher la synthèse de delta endotoxine à un stade avancé de la croissance cellulaire. Toutefois, une concentration élevée de celui-ci entraîne un effet du glucose par lequel les glucides facilement métabolisable réprime la synthèse des enzymes nécessaire à la dégradation des carbones complexes (Ghribi et al. 2012).

L'entomotoxicité mesurée à partir de la formulation du bouillon fermenté ainsi que celle des milieux concentrés montre une entomotoxicité élevée dans le milieu fortifié de soja suivi du milieu soja contrôle et enfin le milieu SIW contrôle. L'entomotoxicité de Btk est basée sur l'action commune des spores et des endotoxines. Les cristaux protéiques se solubilisent à pH basique et se fixent à des récepteurs de l'intestin moyen des cellules épithéliales de la larve. Les cristaux fixés entraînent la création de pores transmembranaire dans les cellules et un

déséquilibre de la pression osmotique de ces dernières. Ceci entraîne une paralysie de l'intestin moyen de la larve qui arrête de se nourrir. Les spores de Btk profitent de l'affaiblissement des larves et peuvent germer à l'intérieur de l'organisme, en se multipliant tout en produisant des endotoxines. Cette propagation de la bactérie entraîne une septicémie chez la larve. Valéro 1990 indique que le mélange spores et cristaux est 4 à 5 fois plus pathogène qu'une solution contenant l'un ou l'autre. Ceci explique la forte mortalité des larves dans les concentrations à 2X, 4X et 6X du milieu SIW fortifié de soja comparativement au milieu soja contrôle et SIW contrôle. La valeur de l'entomotoxicité obtenue à 6X dans la formulation du SIW fortifié de soja est supérieure à celle du Foray 76B (biopesticide commercial), qui est de 20000 UI/μL (30BIU/ha). Cette valeur est décrite comme suffisante pour le traitement d'une surface de 1ha par un volume de 1.5 L (Bauce Eric et al. 2004). Ainsi, une concentration de 2X serait suffisante et permettrait d'augmenter la productivité du procédé de production de ce biopesticide.

Tableau 11 : Concentration des glucides entre 0h et 48h de fermentation dans les milieux SIW et SIW fortifié de soja

Glucides		Glucose	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Xylose
Limite de détection:		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Temps (H)		Résultats (mg/L)	Résultats (mg/L)	Résultats (mg/L)	Résultats (mg/L)	Résultats (mg/L)	Résultats (mg/L)
0	SIW contrôle	940	290	<20	<20	<20	790
48	SIW contrôle	<20	<20	<20	<20	<20	560
0	SIW + 25% soya	2500	780	<20	1600	<20	160
48	SIW + 25% soya	180	100	<20	1300	<20	170

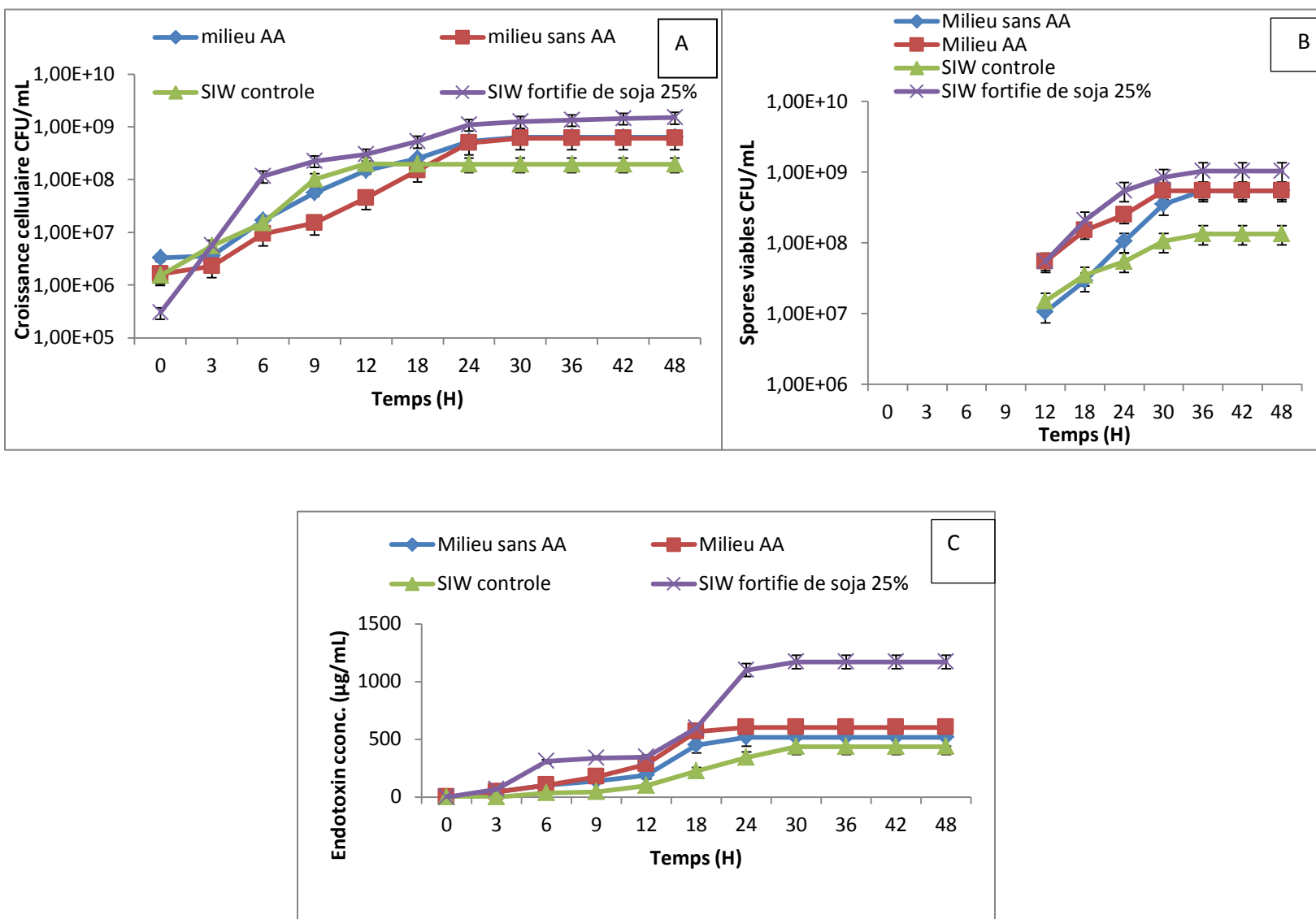


Figure 8 : Profil de croissance cellulaire (A), de sporulation (B) et de synthèse d'endotoxine (C) par Btk pendant 48h de fermentation dans différents substrats

7.2. Fortification du substrat SIW par les substrats boues anaérobies, aérobies et SIW

Afin d'accroître les nutriments supplémentés dans le milieu SIW, les boues aérobies, boues anaérobies et substrat SIW ont été centrifugés et fortifiés à 30g/L dans le SIW. A 48h de culture, le compte des cellules totales et spores viables étaient respectivement de 5.6×10^8

CFU/mL ; 5×10^8 CFU/mL dans le milieu SIW fortifié de 30g/L de SIW, 5.6×10^8 CFU/mL ; 4.5×10^8 CFU/mL dans le milieu SIW fortifié de 30g/L de boues anaérobies, 4.64×10^8 CFU/mL ; 3.5×10^8 CFU/mL dans les boues aérobies. A 48h, la concentration d'endotoxine était respectivement de 680 µg/mL, 540 µg/mL, 450 µg/mL dans les milieux SIW fortifiés de SIW, boues anaérobies et boues aérobies.

Ces résultats comparés au milieu SIW fortifié à 15g/L montre une amélioration de la croissance cellulaire, de la sporulation et de la synthèse des endotoxines dans les milieux SIW fortifiés de boues anaérobies et SIW fortifiés de boues aérobies. Alors que dans les milieux SIW fortifiés de 30g/L de SIW, il n'y'a pas eu d'amélioration dans la croissance cellulaire, la sporulation et la synthèse d'endotoxine. En effet, durant la centrifugation du SIW, le surnageant (non utilisé dans la fortification) contient une fraction importante du carbone organique total qui est sous forme dissoute (VU et al 2008). La fraction du carbone organique particulaire, recueilli dans le culot et qui a servi à la fortification du milieu, ne contient ainsi pas assez de nutriments (carbone) pour soutenir la croissance cellulaire, la sporulation et la synthèse d'endotoxine de Btk. Toutefois, les milieux SIW supplémentés de boues anaérobies et boues aérobies entraînent une augmentation significative de la croissance cellulaire, de la sporulation et de la synthèse d'endotoxine par Btk. En effet, la rhéologie (comportement non-newtonien) des boues (Brar et al. 2006), la viscosité, la présence d'EPS (Nouha et al. 2016), la présence de la fraction de carbone sous forme particulaire (Yezza et al. 2006) permettent de concentrer efficacement les nutriments des boues dans le culot lors de la centrifugation.

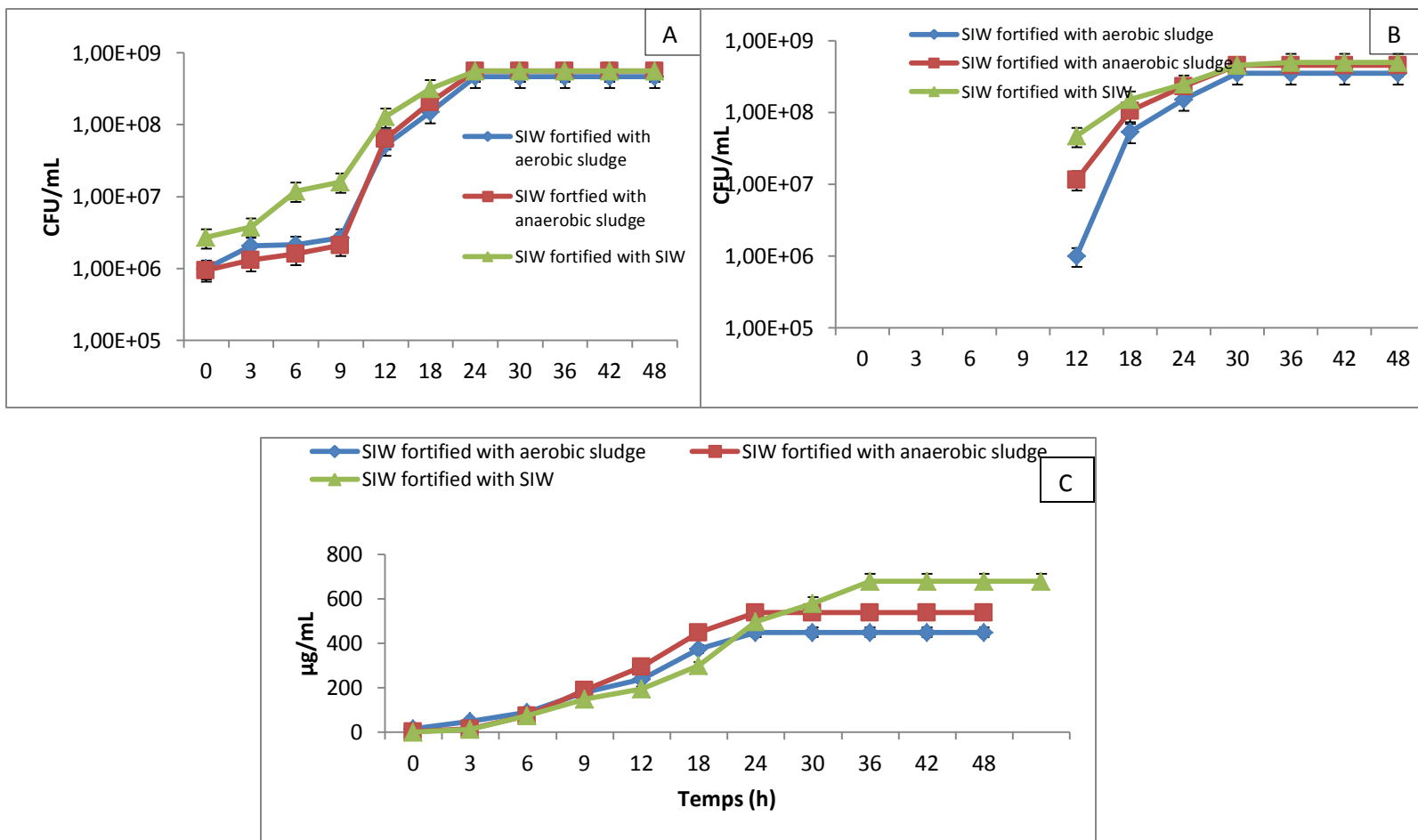


Figure 9 : Profil de croissance cellulaire (A), de sporulation (B) et de synthèse d'endotoxine (C) par Btk pendant 48h de fermentation dans des eaux usées d'amidon fortifiées de SIW, de boues issues de digestion aérobie et anaérobie

7.3. Techniques de floculation avec le chitosane et l'acide tannique (CH-TA)

Les résultats de l'activité de floculation montrent que le chitosane peut agir comme un coagulant et un floculant à pH acide. Toutefois, lorsqu'il est utilisé seul, les flocons ne résistent pas à une forte centrifugation alors que la taille des particules déterminée n'est pas suffisamment importante pour entraîner une décantation rapide et importante.

Les résultats de l'association entre le chitosane à concentration de 400mg\L et différentes concentrations de tannique acide (150 à 900mg\L) à pH 7 témoigne d'une activité de floculation importante à 900 mg\L montrant une augmentation du potentiel zêta (-30mV ; contrôle -60mV), une réduction de la turbidité (95NTU ; contrôle 210 NTU) et une augmentation de la taille des particules (180 μm ; contrôle 115 μm). A pH 5, une concentration de 150 mg\L de chitosane et 500mg\L d'acide tannique a permis une augmentation importante du potentiel zêta (-9mV ; contrôle -50mV), une forte réduction de la turbidité (75 NTU ; contrôle 200NTU) et une taille des particules très importante (295 μm ; contrôle 120 μm). Ces résultats confirment l'action du chitosane à pH acide par une activité de ses charges positives permettant la compression de la double couche ainsi que la réduction du potentiel zêta à la surface de la couche de NERNST et le début de coagulation des particules. De plus, l'attraction générée entre l'acide tannique chargé négatif et le chitosane chargé positif en solution ainsi que la présence des liaisons hydrogènes entre les groupements de l'acide tannique (hydroxyl, hydroxyphenyl) et les peptides des protéines en solution permettent la formation de floccs large et compacte (295 μm ; contrôle 120 μm) (Zhou et al. 2008). Ceci entraîne une décantation efficace capable de réduire la turbidité (75NTU ; contrôle 200NTU) du bouillon fermenté. De plus, lorsque ces bouillons fermentés flocculés sont soumis à la centrifugation, les floccs formés par le complexe CH-TA montrent une plus grande résistance à la centrifugation comparativement aux floccs du chitosane seul (Figure 10). En effet, à 15000 rpm, les cellules totales (2.1×10^2 CFU\mL ; contrôle 1.3×10^5 CFU\mL), spores viables (1.5×10^2 CFU\mL ; contrôle 1.15×10^5 CFU\mL) et endotoxines (550 $\mu\text{g}\text{mL}$; contrôle 480 $\mu\text{g}\text{mL}$) sont encore sous l'effet de la floculation alors qu'à 20000 rpm la floculation est affectée par la force centrifuge (2.5×10^3 CFU\ml ; 2×10^3 CFU\mL ; 460 $\mu\text{g}\text{mL}$).

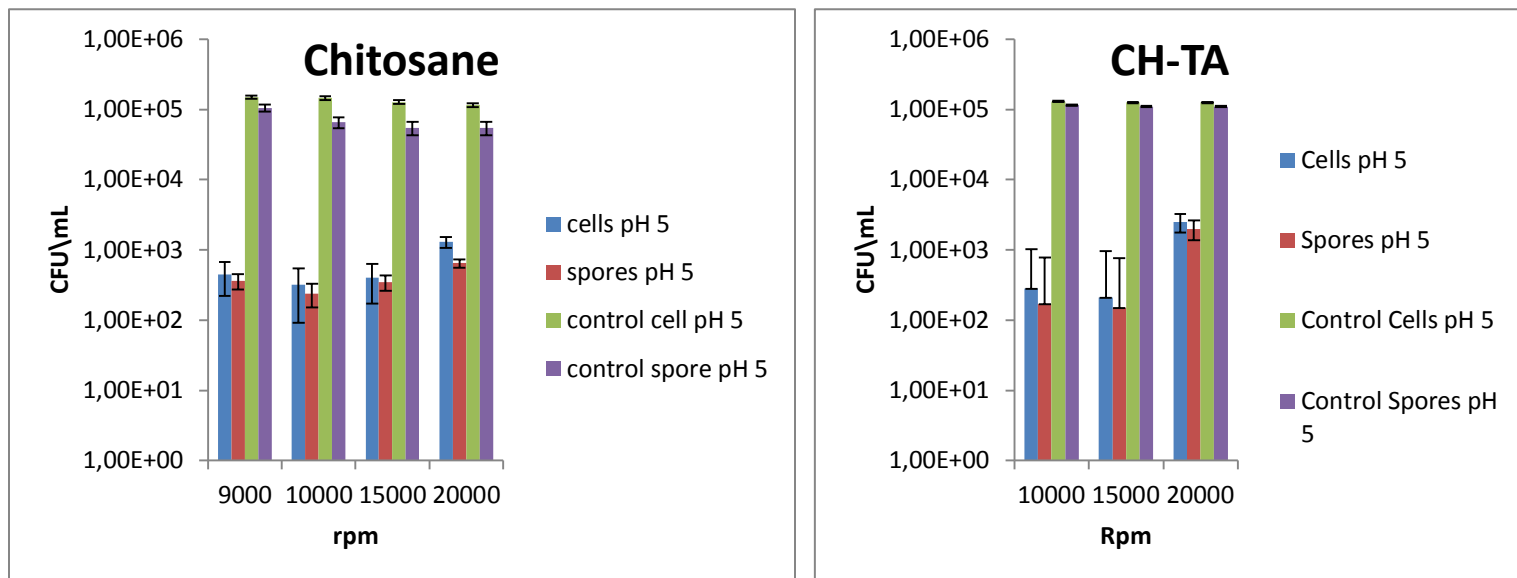


Figure 10 : Effets du chitosane et du chitosane-tannique acide associé à la centrifugation sur les cellules totales et les spores viables de Btk à pH 5

7.4. Demi-vie, dispersion et lessivage de la formulation à base de SIW et SIW fortifié de soja à 25%

La demi-vie de l'entomotoxicité résiduelle ($Tx_{0,5}$) a été déterminée sur les formulations de SIW, SIW supplémentés de soja, SIW supplémenté de soja dilué (F2d), Foray 76B et Btk sander's. Lorsque les formulations (SIW, SIW fortifié de soja, F2d) munies d'agent protecteur contre les rayons U.V (mélasse) ont été exposées aux ultraviolets, la demi-vie obtenue était largement supérieure à celle des formulations commerciales. Brar et al. 2005 mentionne la présence de chromophore tel que l'acide hymathomelanique concentrée dans les formulations des milieux non conventionnels. Cette molécule participerait dans la protection des matières actives de Btk contre les radiations U.V. Alors que la mélasse présente dans les formulations forme une couche protectrice contre les effets néfastes des radiations U.V. En effet, des études montrent que la mélasse a une activité antioxydante. Elle protégerait l'ADN des spores viables et

l'oxydation des cristaux protéiques (Guimaraes et al. 2007 ; Hadapad 2009). Par ailleurs, la demi-vie de la formulation fortifiée de soja était supérieure à celle des formulations SIW et F2d.

Les résultats de dispersion des particules de la formulation ont montré des suspensions élevées entre 95 et 98% pour les formulations SIW, SIW fortifié de soja, F2d, Foray 76B. Alors que les formulations contrôle (sans sorbitol) avaient des suspensions de 77% pour la formulation SIW et 79% pour le SIW fortifié de soja. En effet, le sorbitol contient des radicaux hydroxyles OH⁻ qui entraîne des liaisons avec les cations à un pH acide (formation d'ions H₃O⁺: les formulations étudiées ont un pH 5). Ces liaisons diminuent la disponibilité des ions, molécules et polymères chargés positifs, alors que les charges négatives deviennent prépondérantes. Ainsi, à des distances faibles, les particules complexées au sorbitol ainsi que le sorbitol libre en excès dans la solution se repoussent créant ainsi un état de suspension ou de dispersion dans la solution (Smirnof and Valero 1983). Les valeurs de potentiel zêta (Tableau 10) des formulations témoignent de l'équilibre entre les forces répulsives et attractives qui existent entre les particules en solution ainsi que la stabilité de la dispersion des particules de formulations dans le temps (Ndao et al. 2017).

Le compte des cellules totales de Btk, issu des pulvérisations des formulations SIW, SIW fortifié de soja, F2d et contrôle sur des branches de sapin baumier, a été déterminé. La formulation contrôle contient tous les adjuvants mais est dépourvue de suspension de Btk. Après, une heure de suspension, les trois différentes formulations de Btk montrent des comptes de cellules totales supérieures à 300 CFU/mL par branche de sapins baumier, imprimée sur une gélose nutritive. De 24h à 48h de culture, le compte des cellules totales demeure important. Alors qu'au 5^e jour, un arrosage artificiel de 300mL a été simulé, le compte des cellules totales a diminué passant de 220 CFU/mL à 180 CFU/ml pour la formulation F2d, 180 CFU/mL pour la formulation SIW et 230 CFU/mL pour la formulation SIW fortifiée de soja. Les sapins n'ont plus été arrosés jusqu'à une semaine de décompte cellulaire. Ainsi, l'analyse par branche de sapin baumier traités a montré à 7 jours des comptes de cellules totales 125 CFU/mL pour la formulation F2d, 100 CFU/mL pour la formulation SIW, 150 CFU/mL pour la formulation SIW fortifiée de soja.

Ces résultats démontrent la persistance des formulations et leur résistance aux rayons ultraviolets, à la précipitation et aux substances volatiles (pouvoirs antibiotiques) qui sont émises constamment par des conifères pour se protéger contre les organismes envahissants (bactéries, champignons et autre) (Guenther et al. 1995). Parmi ces substances volatiles des

conifères, l'acétylène, le pinène, l'acétate de bornyl, le phellandrene et le thujone sont répertoriés comme agents antibactériens (Isidorov et al. 1985). Le pouvoir tampon de la formulation conféré par l'acétate de sodium et l'acide acétique permet de résister aux substances volatiles et leur effet sur le pH à court terme (Brar et al.2006). Alors que la présence de la mélasse, du xantham ghum comme agent épaississant permet l'adhésion des formulations sur les branches en dépit des précipitations. Le pouvoir adhésif de la mélasse résulte de la teneur en sucre qui entraîne des liens cohésifs lorsque la mélasse s'assèche sur une surface donnée. De plus, la présence des chaînes polymériques d'acides aminés dans la mélasse tend à former un réseau contigu tridimensionnel en solution. Ce réseau est capable de piéger l'eau à l'intérieur de sa structure et permet de résister au lessivage par la précipitation (Xu et al. 2005). En outre, McGuire et al. (1994) ont montré que les formulations à base d'amidon (eaux usées d'industries d'amidon) résistaient mieux aux précipitations du fait que les particules d'amidon présentent des propriétés adhésives.

Tableau 12: Demi-vie de l'entomotoxicité de différents substrats

Substrats	Demi-vie (jours)
SIW	10 ± 0.5
SIW fortifié de soja	12.5 ± 0.625
F2d	10 ± 0.5
Foray 76B	7 ± 0.35
SIW bouillon fermenté	3 ± 0.15
SIW fortifié de soja (bouillon fermenté)	4 ± 0.2
SIW crème (centrifugation)	5 ± 0.25
SIW fortifié de soja crème (centrifugation)	6 ± 0.3

Tableau 13: Entomotoxicité des différentes formulations

Formulation	Entomotoxicité (IU/μL)
SIW (contrôle)	21000 ± 1680
SIW fortifié de soja	38000 ± 3040
F2d	21500 ± 1720
Btk's sanders	12500 ± 1000
Foray 76B	20000 ± 1600
SIW (bouillon fermenté)	15000 ± 1200
SIW fortifié de soja (bouillon fermenté)	18000 ± 1440

Tableau 14 : Test d'adhésivité des formulations sur des sapins baumiers après décompte des cellules totales

Cellules totales sur les branches (CFU/mL)				
Temps	F2d	SIW	SIW fortifié de soja	Contrôle (adjuvants dans l'eau sans Bk)
1 h	>300 ± 15	>300 ± 15	>300 ± 15	<20 ± 1
24 h	>300 ± 15	>300 ± 15	>300 ± 15	<20 ± 1
48 h	220 ± 11	200 ± 12.5	250 ± 12.5	<20 ± 1
5 d	180 ± 9	180 ± 9	230 ± 11.5	<20 ± 1
7 d	125 ± 6.25	100 ± 5	150 ± 7.5	<10 ± 0.5

8. Conclusions

La protection des forêts et des cultures contre les insectes ravageurs a entraîné l'utilisation abusive de pesticides chimiques, qui se sont avérés néfastes pour la santé (des humains et des animaux), l'environnement et souvent inefficaces dans la lutte contre les insectes. À cet effet, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus recommandée grâce à son efficacité et à l'absence d'impacts négatifs sur l'environnement. Le *Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki* HD-1 représente le biopesticide le plus utilisé et le plus efficace dans la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE). Afin de garder cette dynamique, il est important de tenir en compte les coûts de production et d'apporter une valeur ajoutée au biopesticide. Dans cet optique, la mise au point de nouvelles méthodes innovatrices et économiques de revalorisation des rejets d'industrie agroalimentaire et de station de traitement municipal est souhaitable. Ainsi, l'utilisation des eaux usées d'industrie d'amidon, en tant que substrat pour Btk a été étudiée. Les présents travaux ont donc consisté à mettre au point de stratégies et des méthodes de production visant à augmenter le potentiel entomotoxique ainsi que la productivité dans la formulation du biopesticide :

1. La fermentation de Btk à partir de différents milieux semi-synthétiques (extrait de malt, soja, maïs), alternatifs (eaux usées industrielles d'amidon : SIW) et milieux alternatifs fortifié de milieu semi-synthétique ont permis d'élaborer un milieu riche en nutriments pour la synthèse améliorée de cellules totales, de spores viables et des cristaux proteiques. Le potentiel élevé de la formulation SIW fortifié de soja a permis également de produire une formulation diluée qui assure une meilleure productivité en biopesticide et un potentiel entomotoxique équivalent à la formulation commerciale Foray 76B.

2. Les boues anaérobies et aérobies ne contiennent pas suffisamment de carbone organique total pour une culture et une entomotoxicité de Btk élevée. Tandis que les eaux usées d'amidon traitées à pH 2 permettent une solubilisation importante de matière organique pour la culture de Btk et l'obtention d'un pouvoir larvicide équivalent au biopesticide commercial Foray 76B.

3. Les techniques de coagulation et floculation associées à la centrifugation permettent de réduire considérablement les pertes de matières actives de Btk dans le surnageant. Le chitosane associé à l'acide tannique a permis une floculation importante qui a permis de récupérer efficacement les cellules totales, les spores viables et les endotoxines de Btk. Cet abattement de matières actives de Btk ainsi que le caractère larvicide de l'acide tannique associé à Btk a entraîné une entomotoxicité élevée dans les formulations où l'acide tannique fut présent.

4. Les demi-vies, pour les formulations de Btk à partir des substrats SIW ou SIW fortifié de soja en contact avec les rayons ultraviolet, étaient plus élevées que les demi-vies des formulations commerciales. Les formulations SIW et SIW fortifié de soja pulvérisées sur des branches de sapins baumiers montraient une persistance en forêt après une semaine de test.

5. Différentes formulations liquides de Btk à base d'eaux usées d'amidon, eaux usées d'amidon fortifiées de soja et eaux usées d'amidon fortifiées de soja diluées ont été développées. Les combinaisons en termes de volume du bouillon fermenté, volume du culot et des adjuvants recommandés pour des entomotoxicités spécifiques sont présentées dans le tableau 10.

9. Principales recommandations

Compte tenu des résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche et développement au niveau du doctorat, il est possible de faire les recommandations suivantes :

1. Des études sur la fermentation de Btk à partir des eaux usées d'amidon fortifiées de milieu soja en mode fed-batch devraient être réalisées afin d'évaluer le potentiel entomotoxique du bouillon fermenté. Au cas où le potentiel entomotoxique du bouillon fermenté s'avère équivalent ou proche de 20000 UI/ μ L, le bouillon fermenté pourrait être formulé directement sans étape de centrifugation.

2. Des études doivent être effectuées d'une part pour vérifier la présence d'autres facteurs de virulence de Btk en fonction des substrats, à savoir: les phospholipases, les protéines insecticides végétatives et afin de comprendre l'action synergique de ces facteurs de virulence afin de maximiser l'entomotoxicité de Btk obtenu lors de la formulation

3. Le développement de nouveaux types de formulations de Btk de type poudre mouillable et encapsulantes pour les formulations liquides de Btk correspondantes pourrait s'avérer intéressant dans l'optique de valoriser d'avantage cette technologie.

4. Des bioessais des produits formulés contre d'autres insectes ravageurs, lépidoptères, tels que la fausse-arpenreuse du chou, doivent être réalisés afin d'évaluer le potentiel entomotoxique du biopesticide. Ces résultats pourraient ouvrir d'autres marchés aux produits formulés tels que l'agriculture.

Références

Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M., & Schmitt, P. (2014). Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food microbiology*, *42*, 122-131.

Abdel-Hameed, A. (2001). Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(9), 857-861.

Adang, Michael J., Neil Crickmore, and J. L. Jurat-Fuentes. "Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism." *Insect Midgut Insect. Proteins* *47* (2014): 39.

Adjalle, K. D., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Recovery of entomotoxicity components from *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and sludge: Ultrafiltration scale-up approach. *Separation and Purification Technology*, *69*(3), 275-279.

Adjallé, K. D., Vu, K. D., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2011). Optimization of spray drying process for *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Bioprocess and biosystems engineering*, *34*(2), 237-246.

- Ahmad, A. L., Yasin, N. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879-882.
- Ahmad, M. N., Holland, C. R., & McKay, G. (1994). Mass transfer studies in batch fermentation: Mixing characteristics. *Journal of food engineering*, 23(2), 145-158.
- Al Masry, W. A. (1999). Effect of liquid volume in the gas separator on the hydrodynamics of airlift reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(10), 931-936.
- Alper, M., GÜNEŞ, H., Tatlipinar, A., ÇÖL, B., Civelek, H. S., ÖZKAN, C., & Poyraz, B. (2014). Distribution, occurrence of cry genes, and lepidopteran toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolated from fig tree environments in Aydın Province. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(6), 898-907.
- Andrews, R. E., Bibilos, M. M., & Bulla, L. A. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), 737-742.
- Angus T.A. (1959). Potentiel usefulness of vinyllicates as stickers. *Cano Entomol.*, 91: 254-255.
- Annachhatre, A. P., & Amatya, P. L. (2000). UASB treatment of tapioca starch wastewater. *Journal of environmental engineering*, 126(12), 1149-1152.
- Arnold, B. H., & Steel, R. (1958). Oxygen supply and demand in aerobic fermentations. *Biochemical engineering*, 149.
- Aronson, A. (2002). Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 417-425.
- Aronson, A. I., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 1-8.
- Azmi, N. U., Ghafar, N. S. A., Yin, C. J., Yakubu, S., Adli, A. A., Aziz, N. A. A., & Mustafa, M. (2015). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* biopesticide produced in shrimp pond sludge as alternative culture medium against *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Acta Biologica Malaysiana*, 4(1), 5-16.
- Azzouz, H., Kebaili-Ghribi, J., Daoud, F., Abdelmalak, N., Ennouri, K., Belguith-Ben Hassan, N. & Rouis, S. (2015). Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against pyralid stored-product pests. *Journal of applied entomology*, 139(9), 690-700..
- Balasubramanian, S., and R. D. Tyagi. "Value-Added Bio-products From Sewage Sludge." *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management*(2016): 27.
- Barnabé, S., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Beauchesne, I., & Surampalli, R. Y. (2009). Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the total environment*, 407(5), 1471-1488

Bates, Robert L., Philip L. Fondy, and John G. Fenic. "Impeller characteristics and power." Uh L, VW; Gray, JB (Ed.) *Mixing: theory and practice* 1 (2012): 111-178.

Bauce, É., Carisey, N., Dupont, A., & van Frankenhuyzen, K. (2004). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology*, 97(5), 1624-1634. Bechtel, D. B., & Bulla, L. A. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*, 127(3), 1472-1481.

Ben-Khedher, S., Jebali, J., Houas, Z., Nawéli, H., Jrad, A., Banni, M., & Boussetta, H. (2014). Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4343-4357.

Blais, J. R. 1983. Trends in the frequency, extent, and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada. *Can. J. For. Res.* 13: 539-617.

Bonnefoi, A., & de Barjac, H. (1963). Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. *Entomophaga*, 8(3), 223-229.

Boychyn, M., Doyle, W., Bulmer, M., More, J., & Hoare, M. (2000). Laboratory scaledown of protein purification processes involving fractional precipitation and centrifugal recovery. *Biotechnology and bioengineering*, 69(1), 1-10.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Screening of different adjuvants for wastewater/wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulations. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1065-1079.

Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology*, 6(1), 17-26.

Carroll, J., Li, J., & Ellar, D. J. (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* 261, 99-105.

Cohen, E., Rozen, H., Joseph, T., Braun, S., & Margulies, L. (1991). Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* *kurstaki* from ultraviolet irradiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(3), 343-351.

Beckwith R.C. and Stelzer M.J. (1987). Persistence of *Bacillus thuringiensis* in two formulations applied

by helicopter against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in north central Oregon.

Bell M.R. and Kanavel R.F. (1978). Tobacco budworm development of spray adjuvant to increase effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 71: 350-352.

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Barnabé, S., & Valéro, J. R. (2007). *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*, 42(5), 773-790.

Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International journal of medical microbiology*, 291(2), 67-79.

Bulla, L. A., KARL J. Kramer, and LOREN I. Davidson. "Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*." *Journal of Bacteriology* 130.1 (1977): 375-383.

Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., & Ferré, J. (2016). Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 329-350.

Chavasit, V., & Torres, J. A. (1990). Chitosan-poly (acrylic acid): mechanism of complex formation and potential industrial applications. *Biotechnology progress*, 6(1), 2-6.

Couch T.L. and Ignoffo C.M. (1981) Fonnulation of in sect pathogens. In: Burges H.D.(ed), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* Acadeimic Press, London, UK, Pages 621-634.

Couch, Terry L., and Juan Luis Jurat-Fuentes. "Commercial production of entomopathogenic bacteria." *Mass Production of Beneficial Organisms*. 2014. 415-435.

Dang Vu, K., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Starch industry wastewater for production of biopesticides–Ramifications of solids concentrations. *Environmental technology*, 30(4), 393-405.

Degrémont SUEZ , mémento technique de l'eau, dixième édition, tomp 1 et 2 (2005).

De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4), 193-199.

Deshpande, S. S., S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. "Chemistry and safety of plant polyphenols." *Nutritional and toxicological aspects of food safety*. Springer US, 1984. 457-495.

Devidas, Patil Chandrashekhar, Borase Hemant Pandit, and Patil Satish Vitthalrao. "Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*." *The Scientific World Journal* 2014 (2014).

Dubois, N. R., & Dean, D. H. (1995). Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environmental entomology*, 24(6), 1741-1747.

Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego: Academic Press

- Dubois N.R, Reardon RC. and Mierzejewski K. (1993). Field efficacy and deposit analysis of *Bacillus thuringiensis*, Foray 48B against Gypsy moth. *J Econ. Entomol.*, **86** (1): 27-33.
- Dulmage, H. T., Correa, J. A., & Martinez, A. J. (1970). Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate pathology*, 15(1), 15-20.
- Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S. L. L. A., & Lacey, L. A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Dulmage, H. T., & Rhodes, R. A. (1971). Production of pathogens in artificial media. Burges, HD Microbial control of insects and mites.
- Ebeling, J. M., Welsh, C. F., & Rishel, K. L. (2006). Performance evaluation of an inclined belt filter using coagulation/flocculation aids for the removal of suspended solids and phosphorus from microscreen backwash effluent. *Aquacultural engineering*, 35(1), 61-77.
- En-Xian L., Zhi-Qiang J., Qi-Zhi Z., Xin-Guo J. (2003) A water-insoluble drug monolithic osmotic tablet system utilizing gum arabic as osmotic, suspending and expanding agent. *J Control. Release*, 92: 375-382.
- Ennouri, K., Ben Khedher, S., Jaoua, S., & Zouari, N. (2013). Correlation between delta-endotoxin and proteolytic activities produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* growing in an economic production medium. *Biocontrol science and technology*, 23(7), 756-767.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5389–5394
- Fang, Weiguo, and Raymond J. St Leger. "Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi." *PLoS One* 7.8 (2012): e43069.
- Farrar RR, Ridgway R.L. (1995). Enhancement of activity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against four Lepidopterous insect pests by nutrient-bases phagostimulants. *J Entomol. Sei.*, 30: 29-42.
- Farrera F., Perez-Guevara F., and de la Torre M. (1998) Carbon: nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 758-765.
- Ferry N., Edwards M.G., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. (2004) Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15: 155-161.
- Gašić, Slavica, and Brankica Tanović. "Biopesticide formulations, possibility of application and future trends." *Pesticidi i fitomedicina* 28.2 (2013): 97-102.

- Ghouas, H., Haddou, B., Kameche, M., Canselier, J. P., & Gourdon, C. (2016). Removal of tannic acid from aqueous solution by cloud point extraction and investigation of surfactant regeneration by microemulsion extraction. *Journal of Surfactants and Detergents*, 19(1), 57-66.
- Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2014). Corrosion and stability study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* starch industry wastewater-derived biopesticide formulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(11), 889-896.
- Ghribi, D., Zouari, N., Trigui, W., & Jaoua, S. (2007). Use of sea water as salts source in starch-and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*, 42(3), 374-378.
- Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I. & Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2012.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Puzstai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *Journal of molecular biology*, 254(3), 447-464.
- Guillon M. (1995). Industrial production of insect viruses for biological control. Technical aspects and economical interest. In: *Proceeding of a Conference on Microbial Control Agents in Sustainable Agriculture: Field experience, Industrial Protection and Registration*, October 18-19, 1995, St Vincent, Italy. Pages 65-72.
- Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T. & Pierce, T. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 100(D5), 8873-8892..
- GUIMARAES, C. M., Glao, M. S., Martinez, S. S., Pintado, A. I., Pintado, M. E., Bento, L. S., & Malcata, F. X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *Journal of food science*, 72(1).
- Gulati, R., Saxena, R. K., & Gupta, R. (2000). Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry*, 36(1), 149-155.
- Hadapad, A. B., Hire, R. S., Vijayalakshmi, N., & Dongre, T. K. (2009). UV protectants for the biopesticide based on *Bacillus sphaericus* Neide and their role in protecting the binary toxins from UV radiation. *Journal of invertebrate pathology*, 100(3), 147-152.
- HAIDER, M. Z., KNOWLES, B. H., & ELLAR, D. J. (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry*, 156(3), 531-540.

Hajek, A. E., Strazanac, J. S., Wheeler, M. M., Vermeylen, F. M., & Butler, L. (2004). Persistence of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* and its impact on native Lymantriidae. *Biological Control*, 30(2), 466-473.

Hajek, A. E., and K. van Frankenhuyzen. "Use of Entomopathogens Against Forest Pests." *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. 2017. 313-330.

Hoff, J. E., & Singleton, K. I. (1977). A method for determination of tannins in foods by means of immobilized protein. *Journal of Food Science*, 42(6), 1566-1569.

Hunter, Robert J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Vol. 2. Academic press, 2013.

Hynes, Russell K., and Susan M. Boyetchko. "Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations." *Soil Biology and Biochemistry* 38.4 (2006): 845-849.

HUANG C, CHEN S and PAN JR (2000) Optimal condition for modification of chitosan: A biopolymer for coagulation of colloidal particles. *Water Res.* 34 (3) 1057-1062.

Humphery A (1998) Shake Flask to Fermentor: What have we Learned. *Biotechnol Prog* 14: 3-7

İçgen, Y., İçgen, B., & Özcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Research in microbiology*, 153(9), 605-609.

Ichimatsu, T., Mizuki, E., Nishimura, K., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current microbiology*, 40(4), 217-220.

Ignoffo CM. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomol* 1992; 75: 516-525.

Ignoffo C.M., Shasha B.S., Shapiro M. (1991). Sunlight ultraviolet protection of the *Heliothis* nuclear polyhedrosisvirus through starch-encapsulation technology. *J. Invertebr. Pathol.*, 57: 134-136.

Imai, Yasuhiko, Hirosuke Takei, and Masatoshi Matsumura. "A simple Na₂SO₃ feeding method for KLa measurement in large-scale fermentors." *Biotechnology and bioengineering* 29.8 (1987): 982-993.

Isidorov, V. A., I. G. Zenkevich, and B. V. Ioffe. "Volatile organic compounds in the atmosphere of forests." *Atmospheric Environment* (1967) 19.1 (1985): 1-8.

Jones K.A. (1988). Studies of the persistence of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus on cotton in Egypt. Ph.D. Thesis, University of Reading, UK.

Juarez, P., & Orejas, J. (2001). Oxygen transfer in a stirred reactor in laboratory scale. *Latin American Applied Research*, 31, 433-439.

- Jun, H. K., Kim, J. S., No, H. K., & Meyers, S. P. (1994). Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu wastewater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(8), 1834-1838.
- Jurat-Fuentes, Juan Luis, and Trevor A. Jackson. "Bacterial entomopathogens." *Insect Pathology* (Second Edition). 2012. 265-349.
- Käppeli, O., & Fiechter, A. (1981). On the methodology of oxygen transfer coefficient measurements. *Biotechnology Letters*, 3(10), 541-546.
- Keshavarzi, Mansoureh, H. Salimi, and F. Mirzananadi. "Biochemical and physical requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high biomass yield production." *J. Agric. Sci. Technol* 7 (2005): 41-47.
- Khedher, S. B., Zouari, N., Messaddeq, N., Schultz, P., & Jaoua, S. (2011). Overproduction of Delta-Endotoxins by Sporeless *Bacillus thuringiensis* Mutants Obtained by Nitrous Acid Mutagenesis. *Current microbiology*, 62(1), 38-43.
- Khan, Muhammad Qasim, M. Javed Zaki, and D. Khan. "The influence of moisture and temperature on the survival of *Bacillus thuringiensis* Berliner in autoclaved soil." *International Journal of Biology and Biotechnology* 8.2 (2011): 225-232.
- Khuzhamshukurov, N. A., Yusupov, T. Y., Khalilov, I. M., Guzalova, A. G., Muradov, M. M., & Davranov, K. D. (2001). The Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(6), 596-598.
- Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K. & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587-2627.
- Kumar, Majeti NV Ravi. "A review of chitin and chitosan applications." *Reactive and functional polymers* 46.1 (2000): 1-27..
- Kunitz, Mf. "Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties." *The Journal of general physiology* 30.4 (1947): 291-310.
- Lachhab, K., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37(2), 197-208.
- Laloo, R., Maharajh, D., Görgens, J., & Gardiner, N. (2010). A downstream process for production of a viable and stable *Bacillus cereus* aquaculture biological agent. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(2), 499-508.

Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., & Lee, J. K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3919-3924.

Leggett, M., Leland, J., Kellar, K., & Epp, B. (2011). Formulation of microbial biocontrol agents—an industrial perspective. *Canadian journal of plant pathology*, 33(2), 101-107.

Lisansky, S. G., Quinlan, R., & Tassoni, G. (1993). *Bacillus thuringiensis* production handbook: laboratory methods, manufacturing, formulation, quality control, registration. CPL Scientific Ltd.

Li R.S., Jarrett P. and Burges H.D. (1987) Importance of spores, crystals, and δ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J Invertebr Pathol* 50, 277-284.

Li, Eugenia, and Allan A. Yousten. "Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*." *Applied microbiology* 30.3 (1975): 354-361.

Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 68(1), 11-17.

Lomate, Purushottam R., and Vandana K. Hivrale. "Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin and protease inhibitor on growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner)." *Pesticide biochemistry and physiology* 105.2 (2013): 77-83.

MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Sims, S. R., Hunst, P. L., Greenplate, J. T., Marrone, P. G. & Fuchs, R. L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(2), 258-266.

Malladi, B., & Ingham, S. C. (1993). Thermophilic aerobic treatment of potato-processing wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1), 45-49.

Mazmira, M. M., Ramlah, S. A. A., Rosfarizan, M., Ling, T. C., & Arliff, A. B. (2012). Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9654-9663.

McGuire MR, Shasha BS, Lewis LC, Nelson Te. Residual activity of granular starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* 1994; 84: 631-637.

McGuire M.R, Gillespie R.L., and Shasha B.S. (1994). Survival of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) after exposure to *Bacillus thuringiensis* Berliner encapsulated in flour matrices. *J. Econ. Entomol.*, 29 : 496 - 508.

McLachlan, D. R. C. "Aluminium and the risk for Alzheimer's disease." *Environmetrics* 6.3 (1995): 233-275.

Mehani, Insaf, and Bachir Bouchekima. "Valorization of Waste Dates in South Algeria: Biofuel Production." World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering 9.9 (2015): 1180-1183.

Mohammedi, S., Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process Biochemistry, 41(4), 829-835.

Molloy D.P. (1990). Progress in the biological control of black flies with *Bacillus thuringiensis israelensis*, with emphasis on temperate climates. In: Barjac H., Sutherland DJ. (eds), *Bacterial control of mosquitoes and blackflies*. New Brunswick, NJ: Rutgers University Press, Pages 161-186.

Montoya E.L., Ignoffo C.M., McGarr R.L. (1966) A feeding stimulant to increase effectiveness of, and field test with, a nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 320-324.

More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Biopolymers Production by Mixed Culture and Their Applications in Water and Wastewater Treatment. *Water Environment Research*, 87(6), 533-546. Morneau, Louis. "1. État de situation de l'épidémie de la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec." Actes du colloque. 2014.

Morris O. Protection of *B. thuringiensis* from inactivation by sunlight. *Can Entomol* 1983; 115: 1215-1227.

Muir, James P. "The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem." *Small Ruminant Research* 98.1 (2011): 115-120.

Nakajima, A., & Sakaguchi, T. (2000). Uptake and removal of iron by immobilised persimmon tannin. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 75(11), 977-982

Navon A. Control of Lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs [ed.], *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*, Wiley, New York, 1993; pp. 125-146.

Ndabigengesere, A., & Narasiah, K. S. (1998). Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, 32(3), 781-791

Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2017). Pilot-scale biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using starch industry wastewater as raw material. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(9), 623-630.

Nickerson, K. W., & Bulla, L. A. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology*, 28(1), 124-128.

Nouha, Klai, Ram Saurabh Kumar, and R. D. Tyagi. "Heavy metals removal from wastewater using extracellular polymeric substances produced by *Cloacibacterium normanense* in wastewater sludge supplemented with crude glycerol and study of extracellular polymeric substances extraction by different methods." *Bioresource technology* 212 (2016): 120-129.

Ogiwara, K., Indrasith, L. S., Asano, S., & Hori, H. (1992). Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *Journal of invertebrate pathology*, 60(2), 121-126.

Özbek, B., & Gayik, S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 36(8), 729-741.

Ozergin-Ulgen, K., & Mavituna, F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73(3), 243-250

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325.

Pan, J. R., Huang, C., Chen, S., & Chung, Y. C. (1999). Evaluation of a modified chitosan biopolymer for coagulation of colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 147(3), 359-364.

Paris, M., Tetreau, G., Laurent, F., Lelu, M., Despres, L., & David, J. P. (2011). Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest management science*, 67(1), 122-128. Pearson D, Ward OP (1988) Effect of culture conditions on growth and sporulation of

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol Lett* 10: 451-456

Perani, M., and A. H. Bishop. "Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains." *Microbios* 101.398 (2000): 47-66.

Petersen, S. B., V. P. Jonson, P. Fojan, R. Wimmer, and S. Pedersen. 2004. Sorbitol prevents the selfaggregation

Rajasimman, M., & Karthikeyan, C. (2007). Aerobic digestion of starch wastewater in a fluidized bed bioreactor with low density biomass support. *Journal of hazardous materials*, 143(1), 82-86.

- Rajbhandari, B. K., & Annachhatre, A. P. (2004). Anaerobic ponds treatment of starch wastewater: case study in Thailand. *Bioresource technology*, 95(2), 135-143.
- Rhodes DJ. (1993). Formulation of biological control agents. In: Jones D.G. (ed) *Exploitation of microorganisms* Chapman and Hall, London, UK, Pages 411-439.
- Roome RE. (1975) Field trials with a nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against larvae of *Heiothis armigera* (Hb) (Lepidoptera: Noctuidae) on sorghum and cotton in Botswana. *Bull. Entomol. Res.*, 65: 507-514.
- Rossi, S., Morin, H., Deslauriers, A., & PLOURDE, P. Y. (2011). Predicting xylem phenology in black spruce under climate warming. *Global Change Biology*, 17(1), 614-625.
- Rowe, G. E., & Margaritis, A. (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki. *Biotechnology and bioengineering*, 86(4), 377-388.
- Royama, Tomo-O. "Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*." *Ecological Monographs* 54.4 (1984): 429-462.
- Ruel, J-C., and M. Huot. "Impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette [*Choristoneura fumiferana* (Clem.)] sur la régénération des sapinières après la coupe à blanc." *The Forestry Chronicle* 69.2 (1993): 163-172.
- Salama, H. S., Sharaby, A., & Magd El-Din, M. (1993). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 14(04), 537-543.
- Salama H.S. and Moris O.N. (1993). The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In Entwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., and Higgs S. (eds), *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticides: Theory and Practice*, John Wiley, Chichester, UK, Pages, 237-253.
- Salamitou, S., Ramière, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., ... & Lereclus, D. (2000). The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146(11), 2825-2832
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300.
- Sanders, C. J. 1991. Biology of North American spruce budworms, pp. 579-620. In L.P.S. van der Geest and H. H.
- Schesser, JOHN H., and L. A. Bulla. "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spores to the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." *Applied and environmental microbiology* 35.1 (1978): 121-123.

Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

Semerjian, L., & Ayoub, G. M. (2003). High-pH–magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment. *Advances in Environmental Research*, 7(2), 389-403.

Senthil-Nathan, Sengottayan. "A review of biopesticides and their mode of action against insect pests." *Environmental Sustainability*. Springer India, 2015. 49-63.

Setlow, Peter. "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know." *Journal of bacteriology* 196.7 (2014): 1297-1305.

Shapiro M., Agin P.P., Bell R.A. (1983) Ultraviolet protectants of Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.*, 12: 982-985.

Shasha B.S., McGuire M.R., Behle R.W. (1995) Lignin-based pests control formulations US *Patent Application*, SN08568159.

Smirnoff W.A., Valéro J.R. (1983). Estimation du spectre de la dispersion aérienne de *Bacillus thuringiensis*. *Cano J Microbiol.*, 29 (10): 1277-1279

Smirnoff, W. A., and A. Juneau. 1982. Physical analysis of the dispersion of *Bacillus thuringiensis* against spruce budworm. *Cano Serv. Cano For. Centre Rech For. Laurentides, Ste-Foy, Quebec, Report LAU-X-55*.

Sundaram, A., K. M. S. Sundaram, and L. Sloane. "Spray deposition and persistence of a *Bacillus thuringiensis* formulation (Foray® 76B) on spruce foliage, following aerial application over a northern ontario forest." *Journal of Environmental Science & Health Part B* 31.4 (1996): 763-813.

Stanbury, Peter F., Allan Whitaker, and Stephen J. Hall. *Principles of fermentation technology*. Elsevier, 2013.

Styliani G. Brian W.B. (2005). Suspension polymerisation of methacrylate using sodium polymethacrylate as a suspending agent. *Chem. Eng. Sei.*, 60: 7137-7152.

Tamez-Guerra, P., MCGUIRE, M. R., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L. J., Shasha, B. S., & Vega, F. E. (1996). Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of economic entomology*, 89(6), 1424-1430.

- Tan, Irene S., and Kumaran S. Ramamurthi. "Spore formation in *Bacillus subtilis*." *Environmental microbiology reports* 6.3 (2014): 212-225.
- Tan, Yuping, and William P. Donovan. "Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins." *Journal of biotechnology* 84.1 (2000): 67-72.
- Tanaka, Yoshitake, and Satoshi Omura. "Agroactive compounds of microbial origin." *Annual Reviews in Microbiology* 47.1 (1993): 57-87.
- Tyagi, R., Barnabe, S., Vidyarthi, A., Valro, J., & Surampalli, R. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science & Technology*, 46(10), 247-254.
- Vachon, Vincent, Raynald Laprade, and Jean-Louis Schwartz. "Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review." *Journal of invertebrate pathology* 111.1 (2012): 1-12.
- Valero JR (1990) Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec. L'Aubelle 12-15
- VALICENTE, F. H., TUELHER, E. D. S., LEITE, M. I. S. L., FREIRE, F. L., & VIEIRA, C. M. (2010). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 9(01), 1-11.
- Vilas-Bôas, G. T., & Lemos, M. V. F. (2004). Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian journal of microbiology*, 50(8), 605-613.
- Vidyarthi, A. S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2002). Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, 36(19), 4850-4860.
- Vidyarthi, A., Tyagi, R., & Valéro, J. (2001). Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science & Technology*, 44(10), 253-259.
- Vu, K. D., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2010). Batch and fed-batch fermentation of *Bacillus thuringiensis* using starch industry wastewater as fermentation substrate. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(6), 691-700..
- Wang, D., Sun, W., Xu, Y., Tang, H., & Gregory, J. (2004). Speciation stability of inorganic polymer flocculant–PACl. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 243(1-3), 1-10.

- Wibowo, S., Velazquez, G., Savant, V., & Torres, J. A. (2005). Surimi wash water treatment for protein recovery: effect of chitosan–alginate complex concentration and treatment time on protein adsorption. *Bioresource technology*, 96(6), 665-671.
- Xu, Y., S. Barringer, and V. Alvarez. 2005. Cause and prevention of cane molasses gelling. *J. Food Sci.* 70(8):C461-464
- Yang, Xiao-Ming, and Shaw S. Wang. "Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*." *Biotechnology and applied biochemistry* 31.1 (2000): 71-76.
- Yeza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource technology*, 97(15), 1850-1857.
- Zamola, B., Valles, P., Meli, G., Miccoli, P., & Kajfež, F. (1981). Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 1079-1086.
- Zemmouri, H., Kadouche, S., Lounici, H., Hadioui, M., & Mameri, N. (2011). Use of chitosan in coagulation flocculation of raw water of Keddara and Beni Amrane dams. *Water science and technology: Water supply*, 11(2), 202-210.
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R., & Valéro, J. R. (2014). Wastewater sludge as raw material for microbial oils production. *Applied Energy*, 135, 192-201.
- Zhou, Y., Xing, X. H., Liu, Z., Cui, L., Yu, A., Feng, Q., & Yang, H. (2008). Enhanced coagulation of ferric chloride aided by tannic acid for phosphorus removal from wastewater. *Chemosphere*, 72(2), 290-298.
- Zolfaghari, G., Esmaili-Sari, A., Anbia, M., Younesi, H., Amirmahmoodi, S., & Ghafari-Nazari, A. (2011). Taguchi optimization approach for Pb (II) and Hg (II) removal from aqueous solutions using modified mesoporous carbon. *Journal of hazardous materials*, 192(3), 1046-1055.
- Zouari, Nabil, Safouane Ben Sik Ali, and Samir Jaoua. "Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media." *Enzyme and Microbial Technology* 31.4 (2002): 411-418.
- Zouari, N., and S. Jaoua. "The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23.6 (1999): 497-502.

Zouari, N., Dhouib, A., Ellouz, R., & Jaoua, S. (1998). Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for δ -endotoxin production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69(1), 41-52.

***Bacillus Thuringiensis*-based biopesticide from wastewater starch industries supplemented with semi-synthetic media**

A. Ndao, R.D. Tyagi, J.R. Valéro

Abstract

The starch industrial wastewater substrate (SIW) is a residual medium, which contains required nutrients for *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (Btk) growth, its sporulation and crystals protein synthesis. In this study, SIW medium was supplemented with different synthetic-media: soya, malt extract, corn flour, glutamic acid, glutamate and aspartic acid. These supplements established an optimized medium for Btk cell growth, crystal protein synthesis, sporulation and reduction of the number of centrifugation and volume of fermented broth required for the biopesticide formulation.

Btk growth results reveals that SIW is a poor medium in terms of carbon and organic nitrogen. Fortifying SIW with 25% soya medium results in significant increase in the endotoxin synthesis (increased from 436 to 1200 µg/ml), sporulation (increased from 1.25×10^8 to 1.35×10^9 CFU/mL), cell growth (increased from 1.95×10^8 to 1.65×10^9 CFU/mL) and entomotoxicity (increased from 17 068 to 30 737 IU/µL) compared to the SIW control medium (without fortification) and soya control after 48h fermentation. The malt extract control and corn flour control results in low cell growth.

Entomotoxicity of SIW formulation supplemented with 25% soya resulted in high larvicidal values when concentrated two times (21 367 IU/µL), 4 times (27 166 IU/µL) and 6 times (30 737 IU/µL).

Introduction

The rapidly growing global population in the third world and industrialized countries have required a huge quantity of food resources. To increase the food grain availabilities, farmers and food producers are bound to enhance their productivity, and they cannot afford to have any damage to their crops. Chemical pesticides are used quite frequently to protect crops from pests, which can damage the harvest and eventually decrease the final yield and productivity. Chemical pesticides bring along various disadvantages like pollution of fresh water streams by storm water runoff, ground water seepage, and residual pesticides in the harvest. In fact, the chemical pesticides can lead to development of resistant strains, vectors of human disease and degradation of the ecosystem or the biosphere of the agricultural land (Tanaka Yoshitake and Satoshi Omura 1993). Despite all these disadvantages, the use of chemical pesticides is still in practice because of its lower price, ease of use and effectiveness on the pests (Wilson Clevo and Clem Tisdell 2001). To avoid the disadvantages accompanying the use of chemical pesticides, biopesticides, a green alternative to chemical pesticides, can be employed.

Bacillus thuringiensis (Bt) is well-known bacteria for its parasporal inclusions containing protein crystals which are lethal to many pests of the family Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. Bt can grow very easily on synthetic media. When the cell concentration of Bt reaches its maximum value (during stationary phase), the vegetative cells sporulate and synthesize crystals protein containing delta endotoxin protein (Vu et al. 2012).

The production of biopesticide is often expensive because of the high cost of the raw material (carbon substrates and other nutrients) required for the bacterial growth. The raw material accounts for 40% of the unit production cost of the biopesticide (Brar et al. 2006; Thakor, 2006). Therefore, several researchers have attempted to explore the possibility of utilizing substrates available at lower or no cost like crude gruel, fish meal, corn steep liquor, crude glycerol, corn starch, beetroot pulp, pigeon pea flour, beef extract, and sewage sludge (Zouari and Jaoua 1999; Sarrafzadeh, 2012; Devidas Patil et al. 2014, Tyagi et al. 2002). It was revealed in these studies that these media contains carbon, which is not easily assimilated (starch, sludge). Vu et al. (2012) found that the complex nature of non-assimilable carbon yields protein crystals with high entomotoxicity effect. Also the presence of organic nitrogen (soya, pigeon pea) in Bt fermentation, enhances the toxicity since the organic nitrogen present in the form of amino acids significantly influences the carbon assimilation by supplying free amino acids and the carbon skeleton for TCA (tricarboxylic acid) cycle intermediates for spore formation rendering culture

stability (Sachidanandham et al. 1997). However, complex carbon sources such as sludge do not allow *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* (Btk) to reach high cell concentration (because of complex carbon and high C: N ratio) but can yield high entomotoxicity in the fermentation broth after 48 hours (Yezza, A et al. 2006). Semi-synthetic media, on the other hand, are composed of simple sugars such as carbon source like glucose, which allows better cell growth at the expense of entomotoxicity (Devidas Patil et al. 2014). In fact, easily metabolizable sugars like glucose are known to repress the formation of proteolytic enzymes and TCA cycle enzymes in Bt, which supply precursor metabolites for the expression of sporulation phase (Doi 1989; Osman et al. 2015).

In addition, the presence of inorganic nitrogen source in the media decreases the efficiency of spore formation. It has been revealed that the presence of inorganic nitrogen source sustainably alters the composition of the crystals protein (Icgen et al. 2002; Salehi et al. 2015). The C: N (molar) ratio is also an important parameter to consider. The abundance of nitrogen would cause desynchronization of sporulation and protein crystal synthesis. Farrera et al. (1998) showed in their study that C: N ratio of 7 shows a high endotoxin production while C: N ratio of 4 results into better sporulation.

Considering all the available knowledge, the aim of this study is to formulate a SIW media supplemented with carbon and organic nitrogen source at a suitable concentration to obtain maximum endotoxin synthesis, cellular growth and sporulation in the fermented broth. Further the study was designed to investigate effect of amino acids in Btk growth. Conclusively, the study will improve knowledge about Btk nutritional needs and further reduce the cost of the biopesticide production while simultaneously performing waste valorization.

Materials and Methods

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 (Btk) strain was obtained from Cederlane Laboratories INC (4410 Paletta Court, Bullington, ON, Canada, L7L 5R2). The Btk strain was cultivated and sub-cultured on tryptic soy agar (TSA) at 30°C for 12 h. The pure bacterial subculture was stored at 4°C until used for inoculum preparation. The SIW was collected from ADM-Ogilvie (Candiac, Quebec, Canada) and was used as culture medium for Btk inoculum preparation.

Growth Media for Btk

Starch Industry Wastewater

SIW was freshly collected and stored at 4°C before performing the fermentation. The composition of this medium, analysed by ICP-AES axial Vista, is presented in Table 1. SIW substrate will act as a control when used without semi-synthetic substrate.

Soya Media

Soya medium contains organic soya meal (Moulin aux abenakis, Sainte Claire Qc, Canada), CaCO_3 2 g/L, FeSO_4 0.04 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, glucose 10 g/L, MgSO_4 0.6 g/L, soya flour 30g/L and starch 10 g/L. Various dilutions of this medium (100%, 50% and 25%) were prepared using SIW medium. This semi-synthetic media was used to fortify starch industry wastewater at different proportion (Table 2) or used alone as a control to compare growth, sporulation and crystal synthesis results by Btk.

Malt Extract Media

The malt extract medium (Oxoid Ltd, basingstake, CM0057) was made up of malt flour 30 g/L, CaCO_3 2 g/L, FeSO_4 0.04 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, glucose 10 g/L, MgSO_4 0.6 g/L and starch 10 g/L. This medium was supplemented with SIW medium or used alone as control for Btk cultivation (Table 3).

Corn Flour Media

The corn flour based medium was composed of corn flour (Fleischmann's corn starch Canada 100% pure), CaCO_3 2 g/L, FeSO_4 0.04 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, glucose 10 g/L, MgSO_4 0.6 g/L and starch 10 g/L. It was supplemented to SIW medium or used as control media (Table 4).

Amino Acids

The amino acids present in soya and SIW media (Table 5) were determined by LC-MS/MS (TSQ Quantum Access, Thermo Scientific) using the modified method derived from Lourenco et al., (2002). The samples were hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 24 hours. Digested samples were re-suspended in acetate buffer and filtered through 0.45µm (Thermo Scientific)

microfilters. The column used was C18 HyperSil-Gold 100 mm X 2.1mm X 3 µm. The solvent ratio used was 40% water mixed with 0.1% acetonitrile. The flow rate was maintained at 0.5 mL/min.

The amino acids (aspartic acid, glutamic acid and glutamate) (L-amino acids, SIGMA-aldrich, Steinheim, Germany) were added at an optimised concentration of 0.33 g/L (optimization data provided in annexes) in SIW medium with CaCO₃ 2 g/L, FeSO₄ 0.04 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, Glucose 10 g/L, MgSO₄ 0.6 g/L and starch 10 g/L. Amino acids supplemented media was identified as “AA medium” while the SIW media with CaCO₃ 2 g/L, FeSO₄ 0.04 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, glucose 10 g/L, MgSO₄ 0.6 g/L and starch 10 g/L and without supplementation of amino acids was called “AA-free medium.” The amino acids were dissolved with sterilized distilled water and injected via a sterilized syringe equipped with 0.2-micron filter. These amino acids were not heat sterilized. Okitani et al. (1983) showed a decrease in glutamic acid, glutamine and aspartic acid concentration during the heating process.

Fermentation in 150 L bioreactor

Inoculum

A single colony picked from nutrient agar petri dish containing colonies of Btk was seeded in 250 mL erlenmeyer flasks containing 40 mL of the SIW, soya, corn flour, malt extract or SIW media supplemented with previously cited media. The media was incubated at 30°C, pH 7.0 and 200 rpm for 9 hours (Ndao et al. 2017). This seed culture was transferred into 4 L erlenmeyer flasks containing 2 L of same culture media. The cultivation was carried out under same conditions for 9 hours. Media containing glucose, KH₂PO₄, K₂HPO₄ and MgSO₄ were sterilized separately from the substrate in order to avoid precipitation or the formation of Maillard complex, which are hard to degrade. The latter is composed of a melanoidine complex (carbohydrate linked to amino acids), which is difficult to biodegrade (Zhang et al. 2014).

Btk fermentation with non-fortified inoculum (without the addition of minerals) was studied in bioreactor containing SIW medium supplemented with 25% soya (Table 2). During scale-up, fermentation based on fortified inoculum (Inoculum containing soya, starch and minerals) can have a significant cost.

A non-fortified SIW inoculum (inoculum without soya, starch and minerals) and fortified inoculum were used for Btk fermentations at 150 L bioreactor composed of SIW with 25% soya (Figure 3).

Fermentation in Bioreactor

150 L bioreactor with working volume of 100 L (Biogenie Quebec Canada) was equipped with accessories and programmable logic controls (PLC) systems for dissolved oxygen (DO), pH, agitation, aeration rate and temperature. The software (iFix 3.5 Intellution USA) was used to monitor and control the fermentation parameters. The reactor was sterilized with media. The phosphates, sulfates and glucose components were sterilized separately. The pH and DO probes were calibrated before starting the fermentation. The Inoculum (2 L) was transferred in the reactor under sterile conditions. The fermentation was then performed aseptically at pH 7.0 and 30°C. Samples were collected after every three hours during first 12 hours of the fermentation and every six hours until 48 hours of the fermentation. At the end of the fermentation, the pH of the fermented broth was reduced to 4.5 in order to avoid solubilization of the crystal proteins by the active proteases at the basic pH (Brar et al. 2006). All the samples were analyzed for total cell count, viable spore count, endotoxin, viscosity, reducing sugars and proteases. Entomotoxicity was determined for the final sample after formulation.

Total cell and viable spore

Total cell and viable spore counts were determined by counting bacterial colony forming units (CFU) on TSA (Tryptic Soy Agar) plates. All the CFU counts were obtained from the average value of experiments conducted in triplicates. For total spore count, serially diluted samples were placed in a water bath (Buchler Instruments) at 80°C for 10 min and immediately immersed in ice for 10 min. Then, 0.1 mL of samples from dilutions was plated on TSA medium and incubated at 30°C for 24 h (Imperial II Incubator oven). The presented values are the mean of three separate experiments \pm standard deviation (SD).

Endotoxin estimation

Btk produces cry toxins encoded by different cry genes found on Btk plasmids. Cry toxins consist of parasporal inclusions, which contain crystal proteins or endotoxins. They have a large spectrum of action against larvae of Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera (Schnepf et al. 1998). Endotoxin concentration was determined based on the solubilization of cry protein under alkaline conditions (Zouari and Jaoua 1999). One mL of each sample collected was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The pellet containing the mixture of spores, crystal proteins and cell debris was used to estimate the soluble insecticidal proteins (delta-endotoxin) in alkaline medium. The pellets were washed thrice with 1 mL of 0.14 M NaCl and 0.01 % Triton X-100 solutions. This washing step aids in the removal of soluble proteins and proteases, which might stick to the centrifuged pellets and affect the integrity of the crystal proteins (Vu et al. 2009). The pellets of crystal proteins were dissolved in 0.05N NaOH (pH 12.5) for 3 hours at 30°C. After crystal solubilization, the suspension was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C, and the pellet containing the spores and cell debris were discarded. The supernatant containing the insecticidal crystal protein was used to determine the concentration of delta-endotoxin by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a protein standard (MM Bradford 1976). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Preparation of Biopesticide Formulation

The fermented broth was centrifuged using batch centrifuge (Sorvall RC5c plus superspeed) and the concentrated slurry was recovered. In order to obtain a low viscosity of the concentrated product and to facilitate easy field application, 35 L of fermented broth and 4 kg of chemical additives were added to the 60 L centrifuged slurry (Table 6). The additives were as follows; carboxymethylcellulose (emulsifier, stabilizer), xantham gum (provides better adhesion to the foliage), molasses (adhesion, UV protectant, and phagostimulant) and potassium silicate (combined with sodium acetate buffer). The homogenized ingredients in the fermented broth were mixed with antimicrobial compounds like propionic acid, sorbic acid, and acetic acid. The mixtures of additives, fermented broth, and the centrifuged slurry were homogenized in a large vessel equipped with a stirrer (200 rpm) (Caframo stirrer type RZR50). The pH of the obtained formulated product was 5. It was collected in sterilized bottles. Entomotoxicity potential of the formulation was determined. The final product (Table 6) was stored under sterile conditions.

Entomotoxicity bioassay

The entomotoxicity potential of the biopesticide test samples was evaluated by bioassays on the spruce budworms (TBE) at the larvae stage according to the diet incorporation method of Dulmage et al. (1971).

The formulation samples of SIW control, soya control, and SIW medium fortified with 25% soya tested are formulated with different fermented broth concentration as follows :

- a) Two times concentration:(half of fermented broth volume was centrifuged. The pellet obtained from the centrifugation was formulated with the remaining half of fermented broth.),
- b) Four times concentration:(Three-quarter of fermented broth volume was centrifuged. The pellet obtained from the centrifugation was formulated with the remaining fermented broth),
- c) Six times concentration: (83% (v/v) of fermented broth volume was centrifuged. The pellet obtained from the centrifugation was formulated with the remaining fermented broth).

To perform entomotoxicity bioassay, 1.5 mL of the test sample was added to 30 mL sterile diet containing 1.5% (w/v) sterile agar. After proper stirring, 1 mL of the mixture was placed in tubes of 15 X 45 mm glass tubes previously sterilized in an autoclave and the plastic plugs of which were finely punctured and sterilized by UV rays. A group of 20 tubes was used for each test solution (dilution). Twenty-five tubes were used as blank containing one mL of diet alone, another set of 25 tubes were used as a negative control containing one mL of sterile synthetic media. The third group of tubes was used as a control containing one mL of fermented broth. The final formulation was added (1.5 mL) without dilution in the diet (30 mL). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Protease Activity

Protease activity (PA) was determined according to modified Kunitz (1947) method. A part of the supernatant (in triplicate) was appropriately diluted with borate buffer of pH 8.2 ± 0.1 . PA was assayed by incubating 1 ml enzyme solution with 5 ml casein for 10 min at 37°C in a constant-temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated at pH 8 for 30 min at 37°C to precipitate the complete nonhydrolyzed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of the incubation period, samples and blanks were filtered through Whatman 934-AH paper. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. One PA unit was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate $1 \mu\text{mol}$ ($181 \mu\text{g}$) tyrosine from casein per minute in pH 8 buffer at 37°C . The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Results

Effect of semi-synthetic media supplemented to SIW on Btk growth and sporulation

Table 7, shows Btk cellular growth and sporulation in semi-synthetic media, soya control, malt extract control, corn flour control and their supplement at different concentration in SIW after 48 hours of fermentation. Among the control media,soya media showed higher cell count with 6.6×10^8 CFU/mL and sporulation with 5.5×10^8 CFU/mL for Btk as compared to SIW media (1.95×10^8 CFU/mL; 1.5×10^8 CFU/mL), corn flour media (2.4×10^8 CFU/mL; 1.8×10^8 CFU/mL) and malt extract media (3.5×10^8 CFU/mL; 2.8×10^8 CFU/mL). The soya media with C: N (mol/mol) ratio of 3 shows highest concentration of organic nitrogen as well as carbohydrate compared to SIW, corn flour and malt extract media.

When semi-synthetic media was supplemented to SIW medium at different percentage, Btk total cell count and sporulation were found to be higher in SIW medium fortified with 50% soya (1.1×10^9 CFU/mL; 8.7×10^9 CFU/mL) and SIW medium fortified with 25% soya (1.5×10^9 CFU/mL; 1.15×10^9 CFU/mL). Whereas in SIW medium fortified with 100% soya, Btk growth and sporulation was found to be lower (5.5×10^8 CFU/mL; 4×10^8 CFU/mL). Furthermore, the nutrients present in malt extract and corn flour media appeared insufficient or inadequate to significantly enhance Btk growth and sporulation in association with SIW.

Btk growth from SIW medium fortified with 25% soya, SIW control, fortified with AA and AA-free media.

Figure 1 shows Btk growth in SIW medium fortified with 25% soya, SIW control, “AA media” and “AA-free media”. During 0-6 hours, the cell growth was very fast and in SIW medium fortified with 25% soya, cell count increased from 3×10^5 CFU/mL to 1.15×10^8 CFU/mL, whereas the cell count in SIW control medium, AA and AA-free media was only 1.5×10^7 CFU/mL after 6 hours of fermentation. During 12th hour to 18th hour of fermentation, Btk shows a maximum cell concentration of 1.95×10^8 CFU/mL in SIW control medium whereas cell count reached to maximum at the 30th hour (1.35×10^9 CFU/mL) in SIW medium fortified with 25% soya. AA and AA-free media also exhibited maximum cell count at 30 h of fermentation with 6×10^8 CFU/ml cell count. Btk sporulation in SIW medium started from 12h of fermentation and maturation takes place up to 36h of fermentation with 1.35×10^8 CFU/ml (sporulation of 70%). SIW medium fortified with soya shows a start of sporulation also around 12h up to 30h (of fermentation with a spore count of 1.05×10^9 CFU/ml (70% sporulation)).

Effect of SIW control, SIW fortified with 25% soya, AA and AA-free media on Btk endotoxin synthesis

Btk endotoxin synthesis was measured in different medium (Figure 2). Endotoxin synthesis began early in SIW medium fortified with 25% soya during the 0-9th hour, and reached a high value of 339 (in 9h) $\mu\text{g/mL}$. From 18th hour to 24th hour, endotoxin concentration was doubled from 400 $\mu\text{g/mL}$ to 600 $\mu\text{g/mL}$. From 36th hour onward until the end of fermentation, endotoxin concentration remains stable at 1170 $\mu\text{g/mL}$.

The endotoxin synthesis was insignificant at the beginning of the cultivation in SIW control medium. At 12th hour, endotoxin concentration was 100 $\mu\text{g/mL}$. Further, endotoxin concentration slowly increased from 221 $\mu\text{g/mL}$ (18h) to 340 $\mu\text{g/mL}$ at the 24th hour of fermentation. Maximum endotoxin concentration reached to 446 $\mu\text{g/mL}$ at the 30th hour and remained constant until the end of the fermentation.

In amino acid rich (AA) medium, endotoxin concentration reached 284 $\mu\text{g/ml}$ while in AA-free medium, it was 187 $\mu\text{g/ml}$ at 12h. From 12h to 18h, endotoxin synthesis was high in both media

(566 µg/ml, 548 µg/ml) and reached to 602 and 519 µg/ml, respectively in AA and AA-free media from 24h to 48h of fermentation.

Btk growth and endotoxin synthesis in SIW medium fortified with 25% soya, inoculated with a fortified and a non fortified inoculum

Figure 3 shows growth profile of Btk total cells, viable spores and endotoxin synthesis in SIW medium fortified with soya inoculated with a fortified and a non fortified inoculum. These results show an exponential growth of total cells from 0 to 9h and then a slow growth of total cells from 9h to 30h. From 30 to 48h, the cells are in stationary growth. The cell growth profile shows a cell concentration of 1.65×10^9 CFU/mL for the non-fortified inoculum. While the cell growth profile for the inoculum produced in fortified medium reached 1.35×10^9 CFU/mL.

The profile of the Btk cell sporulation started at 12h for both media. Spore count increased rapidly from 12h to 36h of fermentation for the two media studied. From 36h to 48h, the viable spores count remained constant. At 48 hours of fermentation, the SIW inoculum fortified with soya has a viable spore concentration of 1.05×10^9 CFU/mL, whereas the non-fortified inoculum medium has a viable spore count of 1.35×10^9 CFU/mL.

Figure 3 C shows the profile of Btk endotoxin synthesis. Both profiles show the same trends in delta endotoxin synthesis. From 0h to 12h of fermentation, the concentration of delta endotoxin increased from 0 to 370 µg/mL. From 12h to 24h, the synthesis of delta endotoxin becomes substantial. At 24h, 1100 µg/mL of endotoxin concentration was measured for both media. From 30h to 48h, the delta endotoxin concentrations became constant with 1200 and 1170 µg/mL respectively for inoculum fortified with soya and non-fortified inoculum.

Protease Activity

Figure 4 shows Btk extracellular proteases activity in SIW medium fortified with soya, SIW control medium and AA and AA-free medium. Protease synthesis undergoes a slight increase between 12h and 18h in SIW fermentation. These periods coincide with the onset of bacterial sporulation and the scarcity of easily biodegradable nutrients. Btk shows significant protease activity between 12h and 24 of fermentation in SIW medium fortified with soya. The difference in protease activity is due to the addition of the soybean medium which contains more complex proteins that require protease activity. The low protease activity in the SIW control medium is therefore indicative of the low complex protein content in this medium.

Entomotoxicity

Table 8 presents the entomotoxicity results for various formulations developed from SIW control, soya control and SIW medium fortified with 25% soya. SIW medium fortified with 25% soya showed higher entomotoxicity compared to other media. Entomotoxicity obtained after formulation of 2 folds, 4 folds, 6 folds and fermented broth of SIW medium fortified with 25% soya were 21367 , 27166, 30737 and 17367 UI/ μ L respectively. On the other hand, the soya control media showed relatively higher entomotoxicity for various concentrations, 16500 UI/ μ L for fermented broth, 17512 UI/ μ L for 2-folds, 18077 UI/ μ L for 4-folds and 18924 UI/ μ L for 6-folds .While the SIW control medium showed lower entomotoxicity, 14300 UI/ μ L for fermented broth , 15502 UI/ μ L for 2-folds , 16672 UI/ μ L for 4-folds and 17068 UI/ μ L for 6-folds .

Discussion

The results of growth and sporulation in various semi-synthetic media or mixed media showed the ability of Btk to growth in different substrates. The growth kinetics and its ability to synthesize metabolites are directly related to the type of substrate (Perani and Bishop, 1999; Logan and Vos, 2015). When it comes to bacterial growth, media with organic nitrogen sources have been preferred over inorganic nitrogen (ammonium sulfate, sodium nitrate). The inorganic nitrogen sources are known to yield inferior cell growth, sporulation, endotoxin synthesis by Bt (Devidas et al. 2014). Soya flour is a media rich in protein and carbohydrate as compared to other media like malt extract media, corn flour and SIW media which are rich in carbohydrates but poor in nitrogen (Vu et al. 2012; Zouari and Jaoua, 1999). The low nitrogen content of SIW media and inorganic nature of nitrogen results in poor Btk growth and early sporulation (Liu and Tzeng 2000; Ndao et al. 2017). On the other hand soya medium shows higher cell growth and sporulation among the control media. To achieve higher cell growth and good sporulation, easily biodegradable carbon (i.e. glucose) and proteins are needed at very early stage of fermentation and spore formation stage since they act as the endogenous energy source for 3-phosphoglycerate, which contributes to the formation of ATP required for spore germination (Setlow and Komberg 1970; Pedraza-Reyes et al. 2012). Btk cell grow and spore formation are phenomena that require energy in the form of ATP, derived from glucose metabolism through

the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. Devidas et al. (2014) has improved growth kinetics of a Bt strain, biomass accumulation and sporulation using pigeon pea medium which is rich in protein and easily metabolizable carbohydrate medium comparable to soya medium.

When the semi-synthetic media was supplemented to SIW medium, SIW medium fortified with soya exhibited better cell growth and sporulation along with a C:N ratio at 4.67. Whereas soya control medium has a C:N ratio at 3. These results are in agreement with Zouari et al.1998 who compared different media for Bt cultivation and found that C: N ratio 5 showed highest cell growth and endotoxin synthesis. This carbon supplement in SIW medium, supplemented with soya, helps to achieve better cell growth and sporulation, whereas in the soya medium (nitrogen higher than carbon) exhaustion of the carbon source leads to a lack of cell growth. These results are confirmed by the concentration and consumption of reducing sugars between 0h and 48h measured by LC-MS-MS (Table 9). These results reflect the high carbon concentration in SIW medium fortified with 25% soya compared to the SIW medium as well as Btk's preference for sucrose and glucose. While Xylose, which is a 5-carbon carbohydrate, is not metabolized by Btk (Mazimira et al. 2012). In addition, the nitrogen deficiency in SIW medium (0.45g/L) is improved by fortification of SIW medium with 25% soya (14.4g/L). This nitrogen concentration ensures significant cell synthesis through the availability of ATP from carbohydrate metabolism in Krebs cycle (Devidas et al. 2014).

The SIW medium, supplemented with 25% soya, has the optimal cell growth and sporulation values compared to 50% and 100%. The latter two media have a very high nutrient concentration. This limits cell growth due to low oxygen transfer and the inhibition of enzyme by the substrate necessary for cell metabolism. (Vidyarathi et al., 2002; Boniolo et al. 2012).

Also, fermentation from the SIW non-fortified inoculum (without mineral additions) had cell growth, sporulation and endotoxin synthesis results similar to the SIW inoculum fortified with 25% soya. Indeed, SIW is a substrate that ensures a good pre-culture with no lag phase as it contains nutrients and especially high concentrations of minerals that do not require a soybean supplement.

Btk delta endotoxin synthesis in SIW medium fortified with soya shows a highly endotoxin synthesis compared to SIW control medium. Crystals protein are composed of 95% proteins and 5% carbohydrates (M. Kheshavarzi et al., 2005). The synthesis of the latter requires a significant amount of organic nitrogen and carbon and similar conditions are found in SIW

medium fortified with soya. High availability of ATP during sporulation affects positively the production of crystals protein by Btk. Mazmira et al. 2012 showed that glucose concentration of 8 g/L would trigger delta endotoxin synthesis in advanced growth cells stages. However, a high glucose concentration can lead to a phenomenon named glucose effect in which easily metabolizable carbohydrates suppress the enzymes synthesis which are necessary for degradation of complex carbons (Ghribi et al. 2012).

Btk is auxotrophic to certain amino acids (Kheshavarzi et al., 2005), while glutamic and aspartic acids are known to be essential for the growth of this bacteria (Dharmsthiti, 1985; Tempest and Neijssel, 2012). Protease synthesis in the medium during sporulation and endotoxin synthesis shows the requirement for organic nitrogen or amino acid during this culture period. The optimized AA medium compared to the AA-free medium showed the role of certain amino acids present in the soya medium during endotoxin synthesis. Authors have reported that gram-positive bacteria such as Btk are able to assimilate certain amino acids and concentrate them for future uses (Gale and Taylor, 1947; Conde Arthur et al. 2010). The free amino acids thus accumulated in the cells constitute a reservoir of energy for crystal protein synthesis and sporulation as carbon sources become depleted. In addition, glutamate plays an important role during sporulation by acting as the primary energy source for the assimilation of acetate (Nakata and Halvorson, 1960) into parahydroxybutyrate (Charba and Nakata, 1977). Glutamate has also been shown to lift inhibition on sporulation and protein crystal formation, increasing respiration and acetate uptake (Arcas et al. 1984; Angelo et al. 2010).

Suspended solids losses (endotoxin, total cells and viable spores) account for 50% and 40% during centrifugation respectively in SIW control medium and SIW medium fortified with 25% soya supernatants (Figure 5 and 6). These losses are considerable and greatly lower the biopesticide entomotoxicity. The fortification of the SIW medium with soya enables the fermented broth to be enriched with active ingredients and to concentrate the pellet obtained by centrifugation into endotoxin and viable spores for an enhanced entomotoxicity.

The entomotoxicity measured from the fermented broth formulation as well as the centrifuged formulation shows a high entomotoxicity in the SIW formulation fortified with soya followed by soya control and finally SIW control formulation. Btk entomotoxicity is based on the common action of spores and endotoxins. Crystals protein dissolve at basic pH and bind to receptors in the middle intestine of the larvae's epithelial cells. The attached crystals lead to the creation of transmembrane pores in the cells and an imbalance in the osmotic pressure of the cells. This

leads to middle intestinal paralysis of the larvae which stop feeding. Btk spores take advantage of the weakening of larvae and can germinate inside the organism, multiplying while producing endotoxins. This spread of the bacteria causes septicemia in the larvae. Valéro 1990 indicates that the spores and crystals mixture is 4 to 5 times more pathogenic than a solution containing either. This explains the high mortality of larvae in the 2-folds, 4-folds and 6-folds concentrations of SIW formulation fortified with soya compared to the soya control and SIW control formulation. The value of 6-folds entomotoxicity in SIW formulation fortified soya is greater than Foray 76B (commercial biopesticide), which is 20,000 IU/ μ L. This value is described as sufficient for the treatment of a surface area of 1 ha by a 1.5 L volume (Bauce Eric et al. 2004). Thus, a 2-folds concentration would be sufficient to increase the biopesticide productivity.

Conclusion

Bacillus thuringiensis var Kurstaki, Btk, fermentation from different semi-synthetic media (malt extract, soya, corn flour), alternative media (SIW: Starch industrial wastewater) and alternative media fortified with semi-synthetic media allowed the development of a nutrient-rich medium to enhance total cells, viable spores and endotoxin synthesis. SIW medium fortified with 25% soya has enabled to overcome the loss of active components affecting entomotoxicity during fermented broth centrifugation.

Also, when amino acids were added to the SIW medium, Btk endotoxin synthesis during fermentation was improved.

SIW medium fortification with soya has led to a reduction in the amount of centrifugation required to achieve a similar entomotoxicity as the commercial biopesticides. This enables the productivity of the process to be increased in order to reduce the biopesticide cost production.

References

Adjalle, K. D., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Recovery of entomotoxicity components from *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and sludge: Ultrafiltration scale-up approach. *Separation and Purification Technology*, 69(3), 275-279.

- Angelo, Elisangela Andrade, Gislayne Trindade Vilas-Bôas, and Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez. "Bacillus thuringiensis: general characteristics and fermentation." *Semina: Ciências Agrárias* 31.4 (2010): 945-958.
- Arcas, J., Yantorno, O., Arraras, E., & Ertola, R. (1984). A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnology letters*, 6(8), 495-500.
- Bauce, É., Carisey, N., Dupont, A., & van Frankenhuyzen, K. (2004). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology*, 97(5), 1624-1634.
- Boniolo, F. S., Rodrigues, R. C., Prata, A. M. R., López, M. L., Jacinto, T., da Silveira, M. M., & Berbert-Molina, M. A. (2012). Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(3), 625-636.
- Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976): 248-254.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342.
- Charba, J. F., and H. M. Nakata. "Role of glutamate in the sporogenesis of *Bacillus cereus*." *Journal of bacteriology* 130.1 (1977): 242-248.
- Conde, A., Diallinas, G., Chaumont, F., Chaves, M., & Gerós, H. (2010). Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 857-868.
- DEVIDAS, Patil Chandrashekhar, PANDIT, Borase Hemant, et VITTHALRAO, Patil Satish. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal*, 2014, vol. 2014.
- Dharmsthiti, Saovanee C., Somsak Pantuwatana, and Amaret Bhumiratana. "Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory." *Journal of Invertebrate Pathology* 46.3 (1985): 231-238.
- Doi, Roy H. "Sporulation and germination." *Bacillus*. Springer US, 1989. 169-215.
- Dulmage, H. T., Boening, O. P., Rehnberg, C. S., & Hansen, G. D. (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18(2), 240-245.
- Farrera, R. R., F. Pérez-Guevara, and M. De La Torre. "Carbon: nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73." *Applied microbiology and biotechnology* 49.6 (1998): 758-765.

Gale, E. F., and P. D. Mitchell. "The Assimilation of Amino-Acids by Bacteria. 4. The Action of Triphenylmethane Dyes on Glutamic Acid Assimilation." *Journal of general microbiology* 1.3 (1947): 299-313.

Gale, E. F., and E. Shirley Taylor. "The Assimilation of Amino-acids by Bacteria: 2. The Action of Tyrocidin and some Detergent Substances in Releasing Amino-acids from the Internal Environment of *Streptococcus faecalis*." *Microbiology* 1.1 (1947): 77-84.

Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., & Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2012.

İçgen, Yasemin, Bülent İçgen, and Gülay Özcengiz. "Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources." *Research in microbiology* 153.9 (2002): 605-609.

Keshavarzi, Mansoureh, H. Salimi, and F. Mirzanimadi. "Biochemical and physical requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high biomass yield production." *J. Agric. Sci. Technol* 7 (2005): 41-47.

Kunitz, Mf. "Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties." *The Journal of general physiology* 30.4 (1947): 291-310.

Liu, Bing-Lan, and Yew-Min Tzeng. "Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*." *Biotechnology and bioengineering* 68.1 (2000): 11-17.

Logan, Niall A., and Paul De Vos. "Bacillus." *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2015).

Lourenço, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. O. D. S., & Marquez, U. M. L. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50(3), 233-241.

Mazmira, M. M., Ramlah, S. A. A., Rosfarizan, M., Ling, T. C., & Arliff, A. B. (2012). Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9654-9663.

Nakata, Herbert M., and H. Orin Halvorson. "Biochemical changes occurring during growth and sporulation of *Bacillus cereus*." *Journal of bacteriology* 80.6 (1960): 801.

OKITANI, A., KIM, S. Y., HAYASE, F., CHUNG, T. Y., & KATO, H. (1983). Heat-Induced Changes in Free Amino Acids on Manufacturing Heated Pulps, Purées and Pastes from Tomatoes. *Journal of Food Science*, 48(4), 1366-1367.

Osman, G. E. H., Already, R., Assaeedi, A. S. A., Organji, S. R., El-Ghareeb, D., Abulreesh, H. H., & Althubiani, A. S. (2015). Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive Review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(1), 271.

- Pedraza-Reyes, M., Ramírez-Ramírez, N., Vidales-Rodríguez, L. E., & Robleto, E. A. (2012). Mechanisms of bacterial spore survival. *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Caister Academic Press. Norfolk, UK, 73-84.
- Perani, M., and A. H. Bishop. "Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains." *Microbios* 101.398 (1999): 47-66..
- Sachidanandham, R., et al. "Stabilization and increased production of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* in steady-and transient-state continuous cultures." *Applied microbiology and biotechnology* 47.1 (1997): 12-17.
- Salehi Jouzani, G., Abbasalizadeh, S., Mohammad Fata, M., & Morsali, H. (2015). Development of a cost effective bioprocess for production of an Iranian anti-coleoptera *Bacillus thuringiensis* strain. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(5), 1183-1196.
- Sarrafzadeh, Mohammad Hossein. "Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by plackett-burman method." *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)* 31.4 (2012): 131-136..
- Setlow, Peter, and Arthur Kornberg. "Biochemical Studies of Bacterial Sporulation and Germination XXII. Energy metabolism in early stages of germination of *Bacillus megaterium* spores." *Journal of Biological Chemistry* 245.14 (1970): 3637-3644.
- Tanaka, Yoshitake, and Satoshi Omura. "Agroactive compounds of microbial origin." *Annual Reviews in Microbiology* 47.1 (1993): 57-87.
- TEMPEST, DW, and OM NEIJSSEL. "Eco-Physiological Aspects of Microbial." *Advances in Microbial Ecology* 2 (2012): 105.
- Thakore, Yatin. "The biopesticide market for global agricultural use." *Industrial Biotechnology* 2.3 (2006): 194-208.
- Tyagi, R. D., Foko, V. S., Barnabe, S., Vidyarthi, A. S., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, 46(10), 247-254.
- Valero JR (1990) Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec. L'Aubelle 12-15
- Vidyarthi, A. S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2002). Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, 36(19), 4850-4860.
- Vu, K. D., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2012). Mathematical relationships between spore concentrations, delta-endotoxin levels, and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations produced in different fermentation media. *Bioresource technology*, 123, 303-311.

Wilson, Clevo, and Clem Tisdell. "Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs." *Ecological economics* 39.3 (2001): 449-462.

Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource technology*, 97(15), 1850-1857.

Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R., & Valéro, J. R. (2014). Wastewater sludge as raw material for microbial oils production. *Applied Energy*, 135, 192-201.

Zouari, N., and S. Jaoua. "The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23.6 (1999): 497-502.

Zouari, N., Dhouib, A., Ellouz, R., & Jaoua, S. (1998). Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for δ -endotoxin production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69(1), 41-52.

Table 1: SIW characteristics - Suggested wavelength and estimated detection limit for minerals selected by ICP-AES axial Vista

Minerals	Suggested wavelength (nm)	Estimated detection limit (mg/L)	Concentrations (mg/L)
Al	396.152	0.0013	13
As	193.696	0.0021	21
B	249.678	0.0006	7
Ba	455.403	0.0005	6
Ca	317.933	0.0022	2.890
Cd	214.439	0.0001	< 1
Co	238.892	0.0003	< 3
Cr	267.716	0.00018	5
Cu	324.754	0.0011	11
Fe	238.204	0.00017	100
K	766.491	0.0016	19.500
Mg	279.553	0.00018	5.700
Mn	257.610	0.00004	56.1
Mo	202.032	0.0007	8
Na	588.995	0.0019	33.100
Ni	231.604	0.0007	7
P	177.434	0.003	15.800
Pb	220.353	0.0015	15
S	181.972	0.007	6.100
Sb	217.582	0.003	30
Sc	335.372	0.00008	5.7

Se	196.026	0.005	50
Sn	189.925	0.0018	18
Sr	407.771	0.00017	3
Ti	337.280	0.00011	4
V	292.401	0.0004	4
Zn	206.200	0.0004	37
Physical and chemical characteristics			
Total organic carbon (mg/L)		4990	
Total organic nitrogen (mg/L)		460	
Ammonia nitrogen (mg-N/L)		20.1	
pH		3.5	
Suspended solids (g/L)		4.05	

Table 2 : Soya media composition

Composition	100% (g/L)	50% (g/L)	25% (g/L)	SIW medium fortified with 25% soya (no minerals) (g/L)
CaCO ₃	2	1	0,5	-
FeSO ₄	0,04	0,02	0,01	-
Glucose	10	5	2,5	2,5
K ₂ HPO ₄	2	1	0,5	-
KH ₂ PO ₄	2	1	0,5	-
MgSO ₄	0,6	0,3	0,15	-
Soya flour	30	15	7,5	7,5
Starch	10	5	2,5	2,5

Table 3 : Malt extract media composition

Composition	100% (g/L)	50% (g/L)	25% (g/L)
CaCO ₃	2	1	0,5
FeSO ₄	0,04	0,02	0,01
Glucose	10	5	2,5
K ₂ HPO ₄	2	1	0,5
KH ₂ PO ₄	2	1	0,5
MgSO ₄	0,6	0,3	0,15
Malt extract flour	30	15	7,5
Starch	10	5	2,5

Table 4: Corn flour media composition

Composition	100% (g/L)	50% (g/L)	25% (g/L)
CaCO ₃	2	1	0,5
FeSO ₄	0,04	0,02	0,01
Glucose	10	5	2,5
K ₂ HPO ₄	2	1	0,5
KH ₂ PO ₄	2	1	0,5
MgSO ₄	0,6	0,3	0,15
Corn flour	30	15	7,5
Starch	10	5	2,5

Table 5: Amino acid composition in SIW and soybean media

Aminoacide	SIW mg/L	Soya mg/L
Arginine (ARG)	16	280
Lysine (LYS)	13	235
Histidine (HIS)	9,6	160
Leucine(LEU)+Isoleucine(ILE)	14	290
Méthionine (MET)	<2.5	29
Phénylalanine (PHE)	9,7	200
Thréonine (THR)	11	240
Tryptophane (TRP)	<2.5	<10
Valine (VAL)	9,3	170
Trans-PROLINE	14	290
Cystine(CYS)	29	290
Proline(PRO)	19	320
Acide Aspartique_(ASP)	22	410
Glutamine(GLN)	13	230
Serine(SER)	11	250
Acide Glutamique(GLU)	150	730
Alanine(ALA)	17	200
Glycine(GLY)	20	180
Tyrosine(TYR)	4,0	160
Asparagine(ASN)	8,4	160

Table 6: SIW formulation for a 100L biopesticide volume

Additives	Amount
Suspension (pellet) (L)	60
Propionic acid (L)	0.07
Ascorbic acid (Kg)	0.01
Carboxymethylcellulose (Kg)	0.15
Sorbitol (Kg)	1
Xanthan Gum (Kg)	0.2
Molasses(Kg)	0.3
Potassium silicate(Kg)	0.25
Sodium acetate(Kg)	1.7
Acetic acid(L)	0.25
Fermented broth (L)	35

Table 7: Btk growth and sporulation in soya, SIW, malt extract, corn flour and SIW medium fortified with soya, malt extract and corn flour

Substrates	Total cell count (CFU/ml)	Viable spores (CFU/ml)	Sporulation (%)
SIW+100% soya	$5,5 \times 10^8 \pm 0,15$	$4 \times 10^8 \pm 0,09$	72
SIW + 50% soya	$1,1 \times 10^9 \pm 0,08$	$8,7 \times 10^8 \pm 0,15$	79
SIW + 25% soya	$1,5 \times 10^9 \pm 0,35$	$1,15 \times 10^9 \pm 0,25$	76,6
SIW (Control)	$1,95 \times 10^8 \pm 0,15$	$1,5 \times 10^8 \pm 0,35$	77
Soya (control)	$6,6 \times 10^8 \pm 0,10$	$5,5 \times 10^8 \pm 0,15$	83
SIW + 100% M.E	$4,8 \times 10^8 \pm 0,35$	$3,5 \times 10^8 \pm 0,15$	73
SIW+50% M.E	$5,5 \times 10^8 \pm 0,20$	$4,1 \times 10^8 \pm 0,35$	74,5
SIW + 25% M.E	$6 \times 10^8 \pm 0,14$	$4,9 \times 10^8 \pm 0,15$	81
SIW+ 100% C.F	$3 \times 10^8 \pm 0,17$	$2 \times 10^8 \pm 0,9$	66
SIW +50% C.F	$3,5 \times 10^8 \pm 0,8$	$2,4 \times 10^8 \pm 0,17$	68
SIW +25% C.F	$4,2 \times 10^8 \pm 0,15$	$3,3 \times 10^8 \pm 0,35$	79
Corn flour (control)	$2,4 \times 10^8 \pm 0,20$	$1,8 \times 10^8 \pm 0,15$	75
Malt extract(control)	$3,5 \times 10^8 \pm 0,35$	$2,8 \times 10^8 \pm 0,35$	80

*M.E : Malt extract

*C.F : Corn flour

Table 8 : Entomotoxicity

Substrat	Fermented Broth	2-folds	4-folds	6-folds
SIW	14300 ± 611	15502 ± 250	16672 ± 254	17068 ± 217
Soya	16500 ± 550	17512 ± 350	18077 ± 411	18924 ± 384
SIW+ 25% soya	17367 ± 227	21367 ± 298	27166 ± 421	30737 ± 380

Table 9 : Detection of reducing sugars present in SIW control and SIW medium fortified with soya by LC-MS-MS

		Glucose	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Xylose
Detection limit :		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Times (H)		Results(mg/L)	Results(mg/L)	Results(mg/L)	Results(mg/L)	Results(mg/L)	Results(mg/L)
0	SIW control	940	290	<20	<20	<20	790
48	SIW control	<20	<20	<20	<20	<20	560
0	SIW + 25% soya	2500	780	<20	1300	<20	160
48	SIW + 25% soya	180	100	<20	1600	<20	170

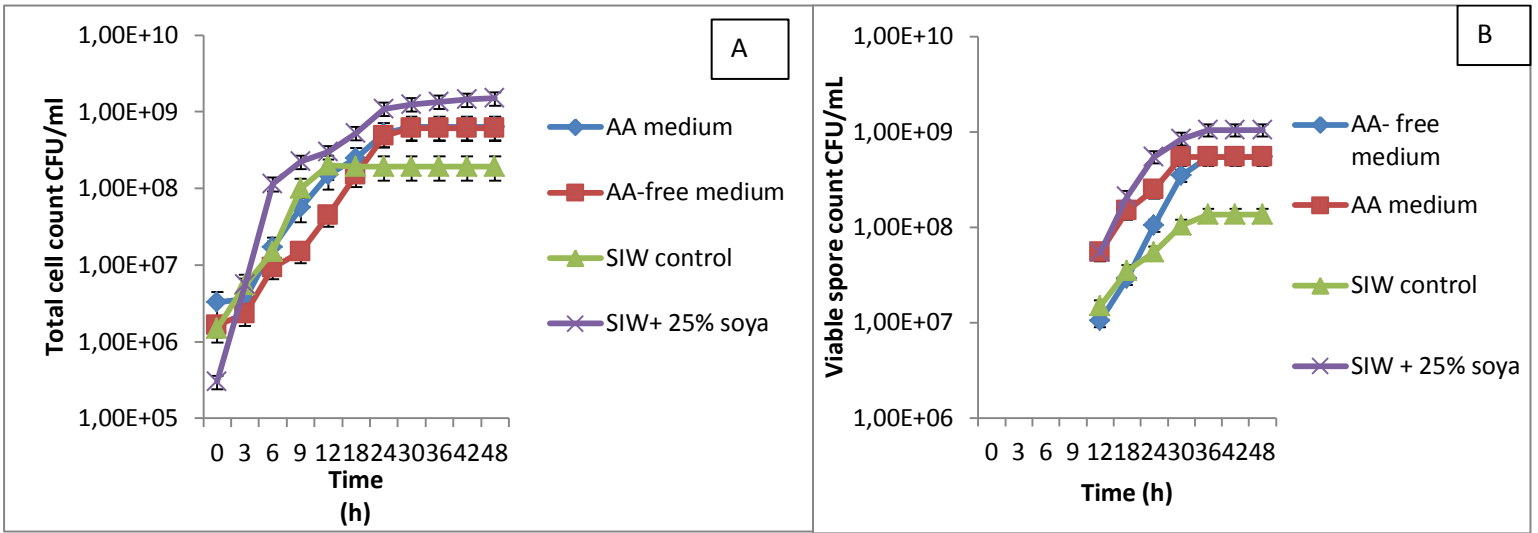


Figure 1: Btk a) total cell count, b) viable spore profile in AA medium, AA-free medium, SIW control and SIW medium fortified with Soya.

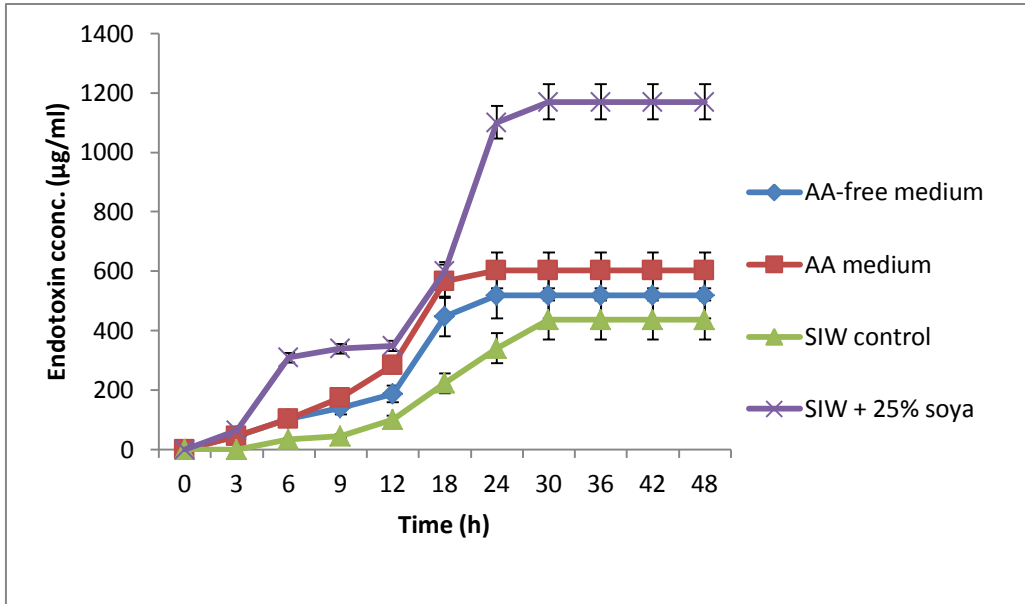


Figure 2: Btk endotoxin synthesis in AA-free medium, AA medium, SIW control and SIW medium fortified with soya 25%.

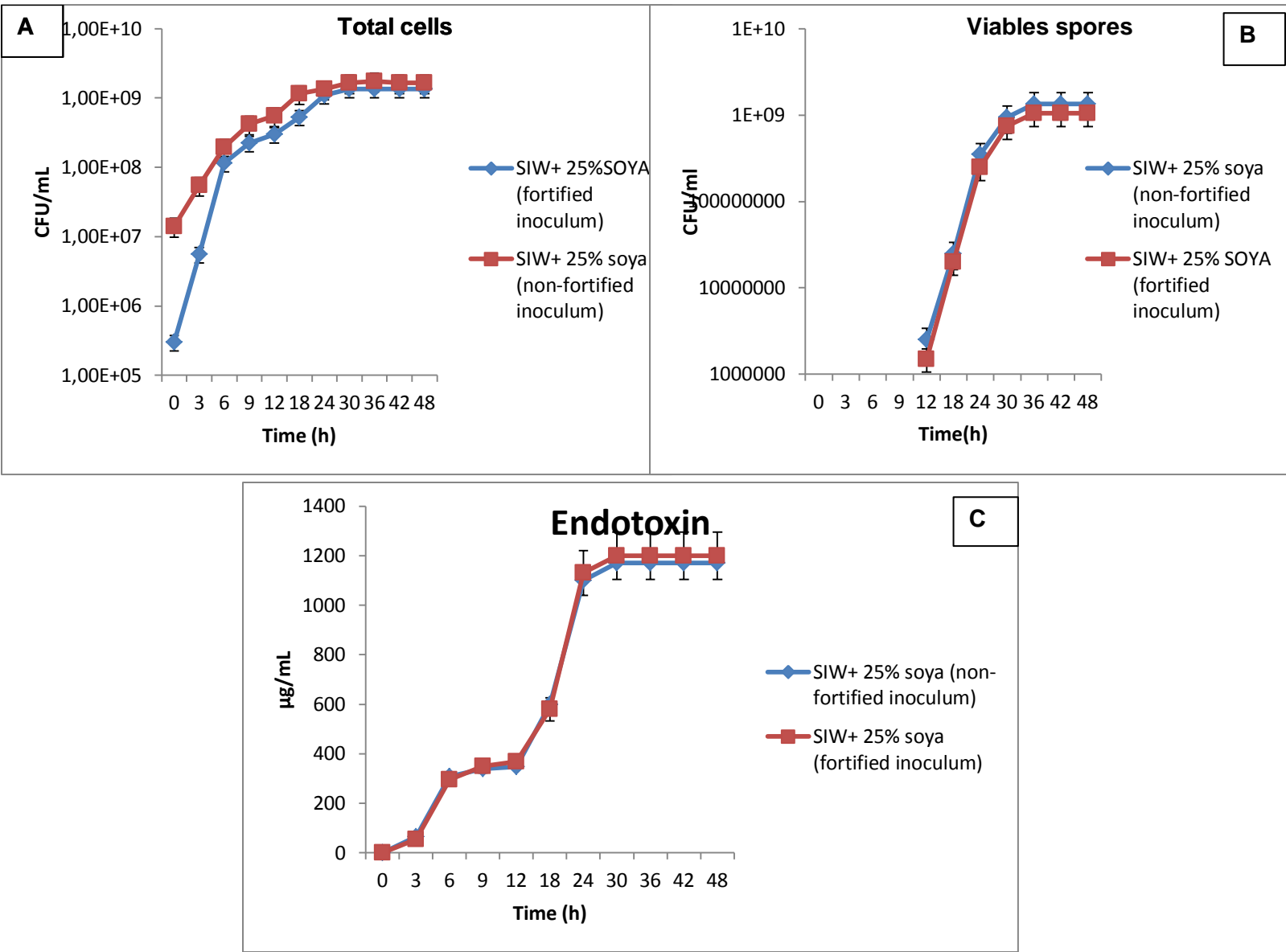


Figure 3 : Total Cell count (A), viable spores count, (B) and endotoxins concentration (C) profiles obtained in 150L bioreactor using SIW medium fortified with 25% soya inoculated with a fortified and a non fortified inoculum

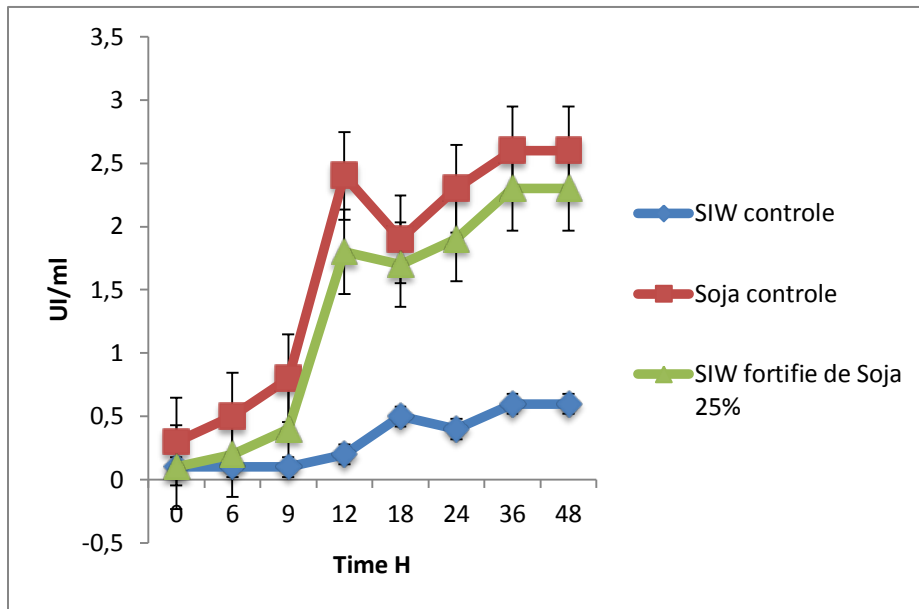


Figure 4 : Btk proteolytic activity profile according to SIW control, AA medium, AA free medium and SIW medium fortified with 25% soya

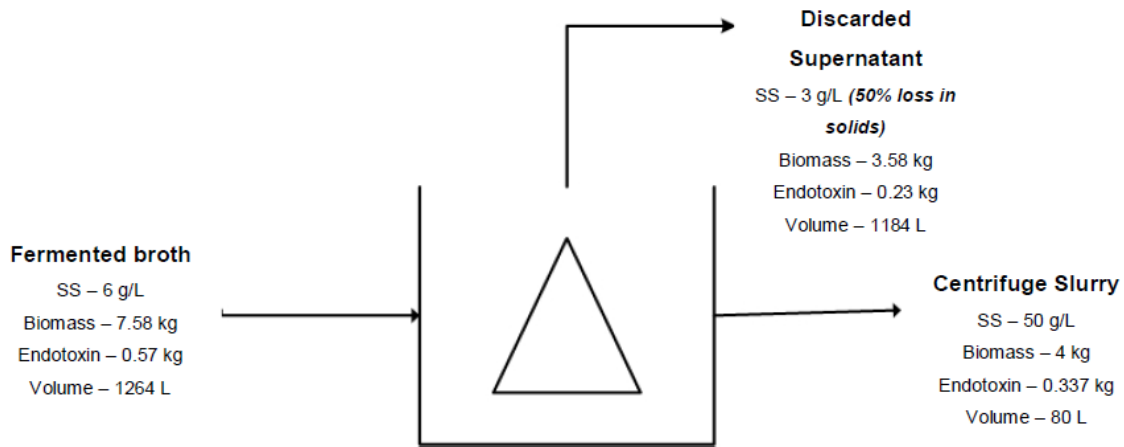


Figure 5: Mass balance of the biopesticide production process using SIW control: biomass losses and endotoxin in supernatant.

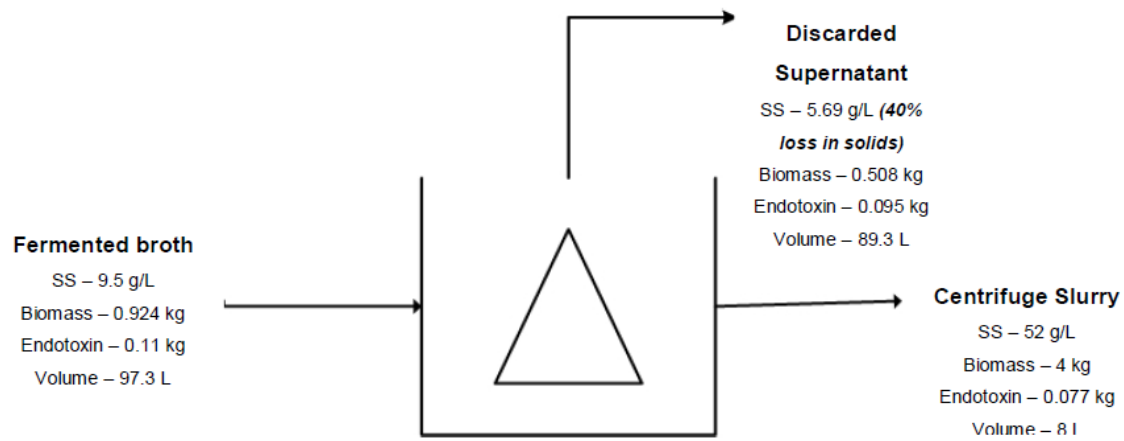


Figure 6: Mass balance of the biopesticide production process using SIW medium fortified with 25% soya: biomass losses and endotoxin in supernatant.

Starch industry wastewater fortified using sludge from aerobic and anaerobic treatment of starch industry wastewater

A Ndao, RD Tyagi, J.R. Valéro

Abstract

This work has led to culture of *Bacillus thuringiensis* var Kurstaki (Btk) in two new alternative substrates, aerobically digested and anaerobically digested sludge obtained from starch industry wastewater (SIW) treatment process. Btk cell growth, viable spores, endotoxin synthesis and entomotoxicity results obtained using anaerobically and aerobically digested sludge were compared to SIW results (cell growth 2.9×10^8 CFU/mL; viable spores 2.4×10^8 CFU/mL; endotoxin synthesis 435 μ g/mL; entomotoxicity 18500 IU/ μ L). The pre-treatment of these 3 substrates at pH 2 with sulfuric acid before fermentation improved the availability of nutrients for bacterial growth. Thus, Btk total cell count, viable spores count, endotoxin concentration and entomotoxicity results were improved by adding anaerobically and aerobically digested sludge to SIW. When anaerobically (Aes) and aerobically digested (Ans) sludge were supplemented with 30 g/L SIW (concentrated SIW containing 30g/L SS), Btk sporulation, cell growth and endotoxin synthesis were improved. While, in case of SIW fortified with concentrated SIW (30 g/L), cell growth and sporulation did not improve. However, endotoxin synthesis (680 μ g/mL) has been improved with an entomotoxicity (22 500 IU/ μ L) higher than the commercial formulation Foray 76B (20 000 IU/ μ L). When physical parameters of these various substrates were determined, significant variations in viscosity, particle size and zeta potential were observed.

Introduction

The harmful use of chemical pesticides has led to several environmental concerns like pollution of groundwater, crops contamination, and environmental degradation. Approximately three million tons of chemical pesticides (\$20 billion a year) are sold worldwide. On the other hand, only \$500 million is allocated to the biological pesticide and more than 60% of the \$500 million is related to *Bacillus Thuringiensis* (Bt) commercial products (Hajeck et al. 2004; Hynes and Susan, 2006). The inherent production costs of semi-synthetic substrate-based biopesticide reduce its accessibility. In addition, the raw material cost for the production of *Bacillus Thuringiensis*-based biopesticide accounts for up to 40% of the total production cost (Linsanky et al., 1993). Thus, an alternative substrate to the semi-synthetic substrate for the production of biopesticide based on *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* (Btk) has been the subject of intensive studies for several decades (Zouari and Jaoua 1999; Sarrafzadeh, 2012; Devidas Patil et al. 2014; Tyagi et al. 2002; Yezza et al. 2005; Ndao et al. 2017). Unconventional alternatives contain essential nutrients for Btk active ingredient synthesis. Yezza et al 2006, showed that the use of residues from starch industries provides a higher entomotoxicity compared to conventional media. In fact, agro-processing residues contain a high concentration of chemical oxygen demand (COD) in the form of carbon and nitrogen sources (starch, gluten, protein, fibre and other minerals) (Rajbhandari and Annachhatre, 2004). It represents a serious problem of treatment and final disposal in the environment. Thus, the general practice is to provide either aerobic (Malladi and Ingham, 1993; Rajasimman and Karthikeyan, 2007) or anaerobic treatment (Annachhatre and Amatya, 2000; Rajbhandari and Annachhatre, 2004) of these residues. In the process of treatment of these types of residues, sludge rich in organic matter are generated. These could contain the needed nutrients for Btk growth. From this perspective, anaerobically and aerobically digested sludge derived from anaerobic and aerobic digestion of starch industry wastewater (SIW) was studied as substrate for Btk culture. Moreover, the physical parameters relating to the viscosity, zeta potential and particle size of these substrates were analyzed before each fermentation.

Materials and methods

Btk strain

Bacillus thuringiensis is a bacterium, gram-positive, aerobic strain and capable of sporulation during stationary growth phase and producing concomitant parasporal crystals. Insecticidal activity is due to the action of viable spores and endotoxins (Cry IAb) contained in parasporal crystals. Endotoxins, which are encoded by cry genes, have insecticidal activities against lepidopteran species and against certain larvae of diptera (flies and mosquitoes) and beetles (scarabids), (Schnepf et al. 1998). The Btk strain was cultivated and sub-cultured on tryptic soy agar (TSA) at 30°C for 12 h. The grown pure bacterial culture was stored at 4°C for inoculum preparation.

Growth Medium

SIW

The culture medium (SIW – starch industry wastewater) for Btk fermentation was obtained from ADM (155 Avenue d' Iberia, Candiac, QC J5R 3H1), a cornstarch processing industry. The composition of this medium, analysed by ICP-AES axial Vista, is presented in Table 1. The Table 2 shows the concentration of total organic carbon (Shimadzu VCPH, NPOC Curve 0 - 5 mg/L), total organic nitrogen (Shimadzu VCPH, TN Curve 0 - 5 mg/L) and ammonia nitrogen (Lachat Method) present in this medium. The SIW is stored in the cold room at 4°C until it is used. Its shelf life is less than two months.

Anaerobic (AnS) and aerobic (AeS) sludge

Starch industry wastewater is rich in COD and BOD (above 300mg/L). The regulations require the treatment of these residual materials before they are discharged into municipal treatment plant pipes. Thus, starch wastewater undergoes first anaerobic digestion (to generate methane) followed by aerobic digestion. Both treatments generate sludge rich in organic matter

(significant organic nitrogen source) named secondary anaerobic sludge (AnS) and secondary aerobic sludge (AeS). The characteristics of these substrates are reported in Table 2.

Fermentation

SIW, anaerobic and aerobic sludge were used as culture substrate for Btk in 5 L bioreactors. The inoculum volume corresponds to 2% (v/v) volume of the final bioreactor (Brar et al. 2006). The 5 L bioreactor with working volume of 3 L was used during the experiments. A pure strain of Btk grown on TSA agar (Tryptic Soja Agar) was used to inoculate the sterilized media in each 250 mL erlenmeyer flasks containing 60 mL SIW or anaerobic sludge or aerobic sludge at pH 7. The inoculum was grown at temperature of 30°C, agitation of 200 rpm for 9 hours in a agitated incubator. Inoculum was transferred to 5 L bioreactor containing previously sterilized medium (SIW or Aes or Ans) and connected to the control system for aeration, agitation, antifoam, base (NaOH), acid (H₂SO₄) and temperature probes. Fermentation, was carried out for 48 hours under similar conditions. At the end of fermentation, pH of the fermented broth was adjusted to 4.5 to eliminate the solubilization of proteins by the proteases active at alkaline pH and to arrest the growth of contaminants. Analysis of the total cell concentration, viable spores, crystals protein was performed on the samples collected after regular intervals.

SIW, Aes and Ans pre-treatment at different pH

SIW, Aes and Ans as substrates are complex media consisting of complex biodegradable materials. These biodegradable materials often require treatment with basic pH (NaOH) or acidic pH (sulphuric acid) to provide high availability of the complex carbon form to microbes (Vu et al. 2008; Yezza et al. 2006). Thus, the each media (50 mL SIW or Aes or Ans) was adjusted to different pH, 2 (sulfuric acid); 7(NaOH); 12 (NaOH) and then sterilized at 121°C, 15 psi pressure for 15 minutes in an autoclave. The suspended solids concentration obtained by batch centrifugation showed that the treatment at pH 2 resulted in significant solubilization of all substrates (Table 2). The pre-treated samples (pH 2 and 7) were analyzed by LC-MS-MS Thermo TSQ Quantum (Table 3).

Fermentation using the substrates treated at pH 2 was carried out in 5 L bioreactor under the same operating conditions as those specified above. Analysis of Btk total cells count, viable spores count and endotoxins was performed and comparison was done with the results obtained by growing BtK without pre-treatment of the substrate.

SIW media fortified with Aes, Ans and SIW medium at different concentrations

Substrates from agro industry residues or wastewater treatment plants were characterized for the presence of nutrients in the form of biosolids or suspended solids (Yezza et al. 2006). These wastes contain suspended solids, dissolved organic carbon (fraction of supernatant during centrifugation), particulate organic carbon (fraction of the pellet during centrifugation), dissolved organic nitrogen, particulate organic nitrogen and ammonia nitrogen. Thus, the Aes and Ans and SIW were concentrated by centrifugation to achieve 15g/L and 30g/L of SS in sludge and then supplemented to the SIW to be used as substrate. SIW medium represents the most nutrient-rich substrate (Table 2).

SIW medium was fortified by concentrated solids obtained by centrifugation of Aes, Ans and SIW substrate. The centrifuged solids were added to SIW and pretreated at pH 2 so that the final concentration of SS in each case was 15g/L or 30g/L. The operating conditions for fermentation were identical to those detailed in fermentation section. Btk total cells count, viable spores count and endotoxin concentrations were measured on fermentation samples collected at 3-hour intervals during the first 12 hours of fermentation and at 6-hour intervals up to 48 hours fermentation.

Total cells and viable spore count

Total cells and spore counts were determined by counting bacterial colony forming units (CFU) on TSA (Tryptic Soy Agar) plates. All the CFU counts were obtained from the average value of experiments conducted in triplicates. For total spore count, serially diluted samples were placed in a water bath (Buchler Instruments) at 80°C for 10 min and immediately immersed in ice for 10 min. Then, 0.1 mL of diluted sample was plated on TSA medium and incubated at 30°C for 24 h (Imperial II Incubator oven). The presented values are the mean of three separate experiments \pm standard deviation (SD).

Endotoxin estimation

Btk produces cry toxins encoded by different cry genes found on Btk plasmids. Those cry toxins consists of parasporal inclusions, which contains crystal proteins or endotoxins. They have a large spectrum of action against larvae of Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera (Schnepf et al. 1998; Gassmann et al. 2014). Endotoxin concentration was determined based on the solubilization of cry proteins under alkaline conditions (Zouari and Jaoua 1999; Mourin et al 2015). One mL of each sample was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The pellet containing the mixture of spores, crystal proteins, and cell debris was used to estimate the soluble insecticidal proteins (delta-endotoxin) in alkaline medium. The pellets were washed thrice with 1 mL of 0.14 M NaCl and 0.01 % Triton X-100 solutions. This washing step aids in the removal of soluble proteins and proteases, which might stick to the centrifuged pellets and affect the integrity of the crystal proteins (Vu et al. 2009). The pellets of crystal proteins were dissolved in 0.05 N NaOH (pH 12.5) for 3 hours at 30°C. After crystal solubilization, the suspension was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C, and the pellet containing the spores and cell debris were discarded. The supernatant containing the insecticidal crystal proteins (soluble) was used to determine the concentration of delta-endotoxin by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a protein standard (MM Bradford 1976). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Zeta potential

Zeta potential (ζ) of each sample was analyzed using Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000 (CAD instrumentation France). The zeta potential values were obtained from the average of 3 measurements. The average values are presented with its half-width confidence interval at 95% confidence level.

Viscosity

An optimal viscosity will provide an uniform distribution of active ingredients on the tree leaves and promote efficient applications. Viscosity was measured using the Brookfield DVII pro, which is a viscometer with Rheocalc 32, SC-34 pin software (small sample adapter)(Gnepe

et al. 2014). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Particle size

Particle size analysis was carried out using a Horiba laser scattering particle size analyzer (LA-950), to produce a particle size distribution. The stirrer and recirculation pump speed were kept at 250 and 500 rpm to minimize the breakage of flocculent particles. For analysis, each sample was analyzed 3 times to confirm the validity and reproducibility of the results. This method is based on the principles of Fraunhofer diffraction and Mie scattering. Results obtained are described below:

D50 indicates that 50% of the particle size fall between the measured value

D90 indicates that 90% of particles are smaller than the obtained value.

D10 indicates that 10% of the particles have a smaller size than the obtained value.

Entomotoxicity bioassay

The entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality of eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray76 B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU) (Dulmage 1970). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented SIW or sludge samples using spruce budworm larvae.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method. In this technique, 1.5mL of serially decimal diluted sample was mixed into 30 mL molten (usually 55^oC) agar based diet and distributed in 20 bioassay tubes (1mL- in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to check the mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The presented values represents the mean of three determination of three independent experiments \pm SD.

Entomotoxicity (UI/ µl) =

$$\frac{\left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-3})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-3})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-4})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-4})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-5})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-5})}\right)}{3} \times 19950$$

Fortification impact on particle size and fermented broth viscosity

The physical characteristics (particle size, viscosity) of the waste media (sludge, starch wastewater) can have a significant impact on fermentation (oxygen transfer) and formulation (droplet size, viscosity, zeta potential). The increased suspended solids concentration and extracellular polymeric substances (EPS) present in sludge can affect particle biosorption, flocculation and floc structure (Laspidou and Rittmann, 2002). High EPS concentration in sludge (aggregation between bacteria and EPS) can lead to high viscosity affecting fermentation and biopesticide formulation (Brar et al. 2006).

Therefore, the analysis of particle size (Horiba, laser scattering particle size distribution analysis LA-950), viscosity (Brookefield DVII pro Rheocalc 32, SC-34) and zeta potential (Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000) was performed on samples of different substrates (Table 4).

Formulation

The fermented broth was centrifuged using a batch centrifuge (Sorval RC5c plus superspeed) and the concentrated slurry was recovered. To obtain a low viscosity of the concentrated product and to facilitate easy field application, fermented broth (after 48 h fermentation) and chemical additives were added to the centrifuged slurry. The ingredients additives were prepared separately. They were used as follows; carboxymethylcellulose (emulsifier, stabilizer), Xanthan gum (provides better adhesion to the foliage), molasses (adhesion, UV protectant, and phagostimulant) and potassium silicate (combined with sodium acetate buffer). The homogenized ingredients in the fermented broth were mixed with antimicrobial compounds like propionic acid, ascorbic acid and acetic acid. The mixtures of additives, fermented broth and the centrifuged slurry were homogenized in a large vessel equipped with a stirrer (200 rpm)

(Caframo stirrer type RZR50). The pH of the formulated product was 5. It was collected in sterilized bottles. Its entomotoxicity potential was analyzed. The final product was stored under sterile conditions.

Results and discussion

Btk total cell growth, viable spores and endotoxin synthesis in Aes, Ans and SIW media

Btk cell growth and sporulation profile in SIW media displayed high total cell count of 2.90×10^8 CFU/mL and viable spores of 2.4×10^8 CFU/mL as compared to btk growth in Ans or Aes after 48h fermentation (Fig 1a, b). Figure 2 shows Btk endotoxin synthesis profile in anaerobic, aerobic and SIW media during 48 hours fermentation. The maximum endotoxin concentration in SIW medium was $435 \mu\text{g/mL}$, whereas in anaerobic and aerobic sludge, the maximum concentrations were at $161 \mu\text{g/mL}$ and $136 \mu\text{g/mL}$ respectively (Figure 2). Btk cell growth, sporulation and endotoxin synthesis are mechanisms that require energy in the form of ATP from carbon metabolism through the Krebs cycle and oxidative phosphorylation (Devidas et al. 2014). Table 2 indicates that total organic carbon (TOC) is significantly lower in anaerobic and aerobic sludge than in SIW. This is due to the fact that during anaerobic and aerobic digestion of starch wastewater, microorganisms utilize the substrate (carbon source) present in the medium. Under anaerobic digestion, there is lower degree of digestion (more carbon present in the sludge) due to presence of large proportion of inactive microorganisms (aerophilic microorganisms) except methanogens and sulfate-reducing microorganisms, which remains active under anaerobic conditions.

Thus, production of biomass during aerobic and anaerobic digestion leads to an enrichment of the sludge in nitrogen source and carbon depletion. Carbon is lost as CO_2 or fixed into methane (biogas generated during anaerobic digestion).

Further, reducing sugars analysis by LC-MS-MS at pH 7 shows that the carbohydrates needed for the synthesis of Btk active ingredients were present at a low concentration in various substrates studied (Table 3). Thus, after treatment at pH 2, the glucose concentration is improved a little in SIW substrates, aerobic sludge and anaerobic sludge. The concentration of galactose and fructose available for Btk has improved in aerobic sludge and SIW substrate. The

xylose concentration, which is a 5-carbon sugar not assimilable by Btk, was improved in three substrates studied. Though a little, but these results may have a direct impact on Btk cell growth, sporulation and endotoxin synthesis in anaerobic, aerobic and SIW media. Btk total cell count and viable spores count was 5.5×10^8 CFU/mL, 4.9×10^8 CFU/mL respectively in SIW; 3.5×10^8 CFU/mL, 2.5×10^8 CFU/mL in anaerobic sludge and 1.5×10^8 CFU/mL, 1×10^8 CFU/mL in aerobic sludge after 48h (Figure 3a, b). To pre-treat, these substrates were adjusted to pH 2 and sterilized. Figure 4 shows Btk endotoxin synthesis profile in media pre-treated at pH 2 (i.e. adjusted to pH 2) and then sterilized. Endotoxin concentration was 550 µg/mL in pre-treated SIW medium, 350 µg/mL in pre-treated anaerobic sludge and 200 µg/mL in pre-treated aerobic sludge. These results confirmed the significant role of assimilable carbon in Btk cell growth, sporulation and endotoxin synthesis.

SIW Fortification by Ans, Aes and SIW

In order to study the contribution of anaerobic and aerobic sludge rich in ammonical nitrogen and organic nitrogen towards Btk growth, sporulation and endotoxin production, anaerobic sludge, aerobic sludge and SIW were separately centrifuged. The centrifuged solids were supplemented to fresh SIW substrate so that their individual solids concentration in SIW was 15g/L and thereafter subjected to Bt fermentation. Figures 5a and 5b shows growth profile of Btk total cells count and viable spores count in SIW alone and SIW fortified with anaerobic and aerobic sludge solids during 48h fermentation. Final cell count and viable spores count was 5.53×10^8 CFU/mL and 4.5×10^8 CFU/mL respectively in SIW medium fortified with SIW after 48h of fermentation. Whereas in SIW medium fortified with sludge, Btk total cell count and viable spores count was 3.95×10^8 CFU/mL; 3.05×10^8 CFU/mL respectively in anaerobic sludge and 2.25×10^8 CFU/mL; 1.25×10^8 CFU/mL in aerobic sludge, after 48h of fermentation. Figure 6 shows Btk endotoxin synthesis profiles in SIW substrates fortified with SIW, aerobic and anaerobic sludge at 15g/L. At 48h of fermentation, endotoxin concentration in the fortified SIW with solids of SIW, anaerobic sludge or aerobic sludge was 649 µg/mL, 430 µg/mL and 358 µg/mL respectively.

Btk cell growth and sporulation results obtained in fortified media showed no significant differences with Aes, Ans or SIW media without fortification (Fig 5). However, the endotoxin synthesis was relatively important in fortified media (Fig 6). These results could be explained by the carbon and nitrogen content in fortified SIW media, which remains insufficient to support

high cell growth. Also, the high ammonical nitrogen (which can evaporate during sterilization) present in Ans and Aes could lead to low Btk growth and sporulation. In fact, several authors mentioned that Btk growth kinetics and the ability to synthesize metabolites were directly related to the type of substrate or nitrogen used. Perani and bishop (1999) mentioned that low nitrogen content and the nature of inorganic nitrogen (ammonia nitrogen) resulted in limited Btk growth and early sporulation (Devidas et al. 2014; Liu and Tzeng 2000). Setlow and Konberg (1970) states that in order to achieve high cell growth and good sporulation, simple sugars such as glucose and proteins in organic forms are necessary at a significant concentration since the beginning of fermentation and during Btk sporulation. In addition, early sporulation, cell growth suppression due to the inadequate nature of nitrogen sources would have resulted in the availability of substrates for endotoxin synthesis. Mazmira et al. (2012) mentioned that a high availability of ATP during Btk sporulation, positively affected the production of crystals protein.

In order to increase the nutrients in SIW medium, Aes, Ans and SIW substrate were centrifuged. The centrifuged solids were added to SIW and pretreated at pH 2, so that the final concentration of SS in each case of SIW was 30g/L. The profiles of Btk cell count and spore count obtained in these 3 types of medium are presented in Figure 7a and 7b. At 48h, total cells count and viable spores count were 5.6×10^8 CFU/mL, 5×10^8 CFU/mL in SIW fortified with 30g/L SIW; 5.6×10^8 CFU/mL, 4.5×10^8 CFU/mL in SIW fortified with 30g/L anaerobic sludge; 4.64×10^8 CFU/mL, 3.5×10^8 CFU/mL in SIW fortified with 30g/L aerobic sludge. At 48h, endotoxin concentration was 680 μ g/mL, 540 μ g/mL, 450 μ g/mL, respectively in SIW fortified with 30g/L SIW, SIW fortified with 30g/L anaerobic sludge and SIW fortified with 30g/L aerobic sludge (Figure 8).

These results when compared to 15g/L fortified SIW medium showed an improvement in cell count, spore count and endotoxin synthesis in SIW fortified with solids of SIW or solids of aerobic or anaerobic sludge. However, fortifying SIW with 30g/L solids of SIW, there was no improvement in Btk cell count or spore count (Fig 7) but improved endotoxin synthesis (Fig 8) as compared to fortified SIW with 15g/L solids of SIW. In fact, during SIW solids fortification, the supernatant of SIW (not used in fortification) contains a significant fraction of total organic carbon that is in dissolved form (VU et al 2008). The fraction of particulate organic carbon, collected in the pellet and used to fortify the medium, does not contain enough nutrients (carbon) to support Btk cell growth, sporulation and endotoxin synthesis. However, SIW media supplemented with Ans and Aes (15g/L SS) significantly increased cell growth, sporulation and endotoxin synthesis. The rheology (non-newtonian behaviour) of sludge (Brar et al. 2006), the

viscosity, the presence of EPS (Nouha et al. 2016), the presence of the carbon fraction in particulate form (Yezza et al. 2006) provide an effective sludge nutrients in the pellet after centrifugation.

Particle size, viscosity and zeta potential in different substrates

Table 4 presents the values of viscosity, particle size and zeta potential of the different substrates studied. These values reflect the treatment/ fortification effect of substrates on the physical parameters prior to fermentation. Viscosity, particle size and zeta potential values of SIW are lower than those found in Ans and Aes. Whereas substrates treated at pH 2 showed lower values of viscosity, particle size and zeta potential than untreated substrates. Substrate treatment at pH 2 lead to the solubilization of organic matter, which resulted in a reduction of viscosity, particle size and zeta potential. In addition, when the SIW substrate was fortified with aerobic sludge or anaerobic sludge or SIW solids, the SIW viscosity, particle size and zeta potential values increased with increase in the concentration of the added solids.

The viscosity of a substrate plays a crucial role in oxygen transfer from the gas phase to the liquid phase. When a medium is highly viscous, it does not provide optimal or required oxygen transfer and the oxygen transfer coefficient (KLa) measurement shows a low oxygen transfer. As a result, bacterial cell growth, sporulation and endotoxin synthesis are affected (Pramuk, 2000; Ndao et al. 2017, Flores et al. 1997; Ozbek and Gayik, 2001).

The zeta potential shows the stable or unstable nature of colloids in solution (Figure 9). SIW particles showed a tendency to coagulate in solution whereas aerobic and anaerobic sludge shows colloid stability. Aerobic and anaerobic sludge are rich in microorganisms, mostly negatively charged bacteria and polymeric substances (negatively charged) synthesized by these microorganisms (Nouha et al 2016; More et al. 2015). The high presence of these negative charged entities in the diffuse layer and the surface of colloids favours repulsion between colloidal particles as indicated by the zeta potential stability, described by the double-layer theory Derjagun, Landau, Verwey, and Overbeek: DLVO (Verwey et al. 1955).

The zeta potential characteristic in anaerobic and aerobic sludge could stabilize viscosity, avoiding coagulation of particles during fermentation. Vu et al (2009) described that interaction

of particles during fermentation would be sufficient to cause high viscosity. Moreover, the stability of zeta potential in anaerobic and aerobic sludge could be an advantage in biopesticide formulation. In fact, particles dispersion in formulation is an important property that is required by addition of additives such as sorbitol (Brar and al. 2006; Ndao et al. 2017).

Entomotoxicity bioassay

After centrifugation and formulation, entomotoxicity of the different formulations obtained from fermented broth of different substrates was measured (Table 6). Entomotoxicity of SIW, Ans and Aes formulations pre-treated at pH 2 displayed results superior to untreated media formulations. The entomotoxicity of SIW treated at pH 2 is even equivalent to the standard Foray 76B. While, the entomotoxicity value of fortified SIW with Aes, Ans and SIW solids at 15g/L showed results below or equivalent to those obtained without fortifications. Further, the fortified SIW formulations with Ans, Aes and SIW solids at 30g/L exhibited lower (Ans and Aes) or slightly superior (fortification with SIW) to the entomotoxicity results obtained from substrates without fortification.

Btk entomotoxicity is based on the synergistic action of spores and endotoxins. Protein crystals dissolve at basic pH and bind to receptors in the middle intestine of the larvae's epithelial cells. These crystals lead to the creation of transmembranous pores in the cells and an imbalance in the osmotic pressure of the cells. This leads to paralysis of the middle intestine of the larvae that stop feeding. Btk spores benefit from the weakening of larvae and can germinate within the body, multiplying while producing more endotoxins (E. Schnepf et al. 1998). This spread of the bacteria causes septicemia in the larvae. Valéro (1990) indicated that the spores and crystals mixture is 4 to 5 times more pathogenic than a solution containing either.

Conclusion

These experiments investigated *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Btk) culture using starch industry wastewater (SIW), anaerobic and aerobic sludge obtained from starch industry wastewater. The results showed that anaerobic and aerobic sludge did not contain enough total organic carbon to augment Btk growth and entomotoxicity. While SIW pre-treatment at pH 2, provided a significant organic matter solubilization for Btk culture and resulted in larvicidal

potency equivalent to the commercial biopesticide Foray 76B. SIW fortification with 30 g/L concentrated SIW increased the formulation entomotoxicity.

References

Annachhatre, A. P., & Amatya, P. L. (2000). UASB treatment of tapioca starch wastewater. *Journal of environmental engineering*, 126(12), 1149-1152.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water research*, 40(6), 1310-1320.

Devidas, Patil Chandrashekhar, Borase Hemant Pandit, and Patil Satish Vitthalrao. "Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*." *The Scientific World Journal* 2014 (2014).

Dulmage, H. T., Boening, O. P., Rehnborg, C. S., & Hansen, G. D. (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *Journal of invertebrate pathology*, 18(2), 240-245.

Flores, E. R., Pérez, F., & de la Torre, M. (1997). Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of fermentation and bioengineering*, 83(6), 561-564.

Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Clifton, E. H., Dunbar, M. W., Hoffmann, A. M., Ingber, D. A., & Keweshan, R. S. (2014). Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5141-5146.

Hajek, A. E., Strazanac, J. S., Wheeler, M. M., Vermeylen, F. M., & Butler, L. (2004). Persistence of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* and its impact on native *Lymantriidae*. *Biological Control*, 30(2), 466-473.

Hynes, Russell K., and Susan M. Boyetchko. "Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations." *Soil Biology and Biochemistry* 38.4 (2006): 845-849.

Laspidou, Chrysi S., and Bruce E. Rittmann. "A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass." *Water research* 36.11 (2002): 2711-2720.

Lisansky, S. G., Quinlan, R., & Tassoni, G. (1993). *Bacillus thuringiensis* production handbook: laboratory methods, manufacturing, formulation, quality control, registration. CPL Scientific Ltd.

- Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 68(1), 11-17.
- Malladi, B., & Ingham, S. C. (1993). Thermophilic aerobic treatment of potato-processing wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1), 45-49.
- Mazmira, M. M., Ramlah, S. A. A., Rosfarizan, M., Ling, T. C., & Arliff, A. B. (2012). Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9654-9663.
- More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Biopolymers Production by Mixed Culture and Their Applications in Water and Wastewater Treatment. *Water Environment Research*, 87(6), 533-546.
- Mourin, M., Shishir, A., Khan, S. N., & Hoq, M. M. (2015). Regulation of major cultural components for designing a cost effective medium to increase δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 14(16), 1379-1386.
- Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2017). Pilot-scale biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using starch industry wastewater as raw material. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(9), 623-630.
- Nouha, Klai, Ram Saurabh Kumar, and R. D. Tyagi. "Heavy metals removal from wastewater using extracellular polymeric substances produced by *Cloacibacterium normanense* in wastewater sludge supplemented with crude glycerol and study of extracellular polymeric substances extraction by different methods." *Bioresource technology* 212 (2016): 120-129.
- Özbek, B., & Gayik, S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 36(8), 729-741.
- Perani, M., & Bishop, A. H. (1999). Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. *Microbios*, 101(398), 47-66.
- Pramuk Parakulsuksatid, (2000). Utilization of microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot scale baker's yeast fermentation unit, Master Science, Faculty of the verginia, USA
- Rajasimman, M., & Karthikeyan, C. (2007). Aerobic digestion of starch wastewater in a fluidized bed bioreactor with low density biomass support. *Journal of hazardous materials*, 143(1), 82-86.
- Rajbhandari, B. K., & Annachhatre, A. P. (2004). Anaerobic ponds treatment of starch wastewater: case study in Thailand. *Bioresource technology*, 95(2), 135-143.

Sarrafzadeh, Mohammad Hossein. "Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by plackett-burman method." *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)* 31.4 (2012): 131-136.

Setlow, Peter, and Arthur Kornberg. "Biochemical Studies of Bacterial Sporulation and Germination XXII. Energy metabolism in early stages of germination of *Bacillus megaterium* spores." *Journal of Biological Chemistry* 245.14 (1970): 3637-3644.

Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

Tyagi, R. D., Foko, V. S., Barnabe, S., Vidyarthi, A. S., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, 46(10), 247-254.

Valero JR (1990) *Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec*. L'Aubelle 12-15

Verwey, Evert Johannes Willem, and J. Th G. Overbeek. "Theory of the stability of lyophobic colloids." *Journal of Colloid Science* 10.2 (1955): 224-225.

Vu, K. D., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(4), 511-519.

Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource technology*, 97(15), 1850-1857.

Yezza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2005). Production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in batch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(5), 502-510.

Zouari, N., and S. Jaoua. "The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23.6 (1999): 497-502.

Table 1 : SIW characteristics - Suggested wavelength and estimated detection limit for minerals selected by ICP-AES axial Vista

Minerals	Suggested wavelength (nm)	Estimated detection limit (mg/L)	Concentrations (mg/L)
Al	396.152	0.0013	13
As	193.696	0.0021	21
B	249.678	0.0006	7
Ba	455.403	0.0005	6
Ca	317.933	0.0022	2.9
Cd	214.439	0.0001	< 1
Co	238.892	0.0003	< 3
Cr	267.716	0.00018	5
Cu	324.754	0.0011	11
Fe	238.204	0.00017	100
K	766.491	0.0016	19.5
Mg	279.553	0.00018	5.7
Mn	257.610	0.00004	56.1
Mo	202.032	0.0007	8
Na	588.995	0.0019	33.1
Ni	231.604	0.0007	7
P	177.434	0.003	15.8
Pb	220.353	0.0015	15

S	181.972	0.007	6.1
Sb	217.582	0.003	30
Sc	335.372	0.00008	5.7
Se	196.026	0.005	50
Sn	189.925	0.0018	18
Sr	407.771	0.00017	3
Ti	337.280	0.00011	4
V	292.401	0.0004	4
Zn	206.200	0.0004	37

Table 2: Physical and chemical characteristics of substrates

Substrates	SIW	Secondary aerobically digested sludge	Secondary anaerobically digested sludge
Total organic carbon (mg/L)	4990	154	135
Total organic nitrogen (mg/L)	460	397	367
Ammonia nitrogen (mg-N/L)	20.1	208	395
pH	3.5	5	8.5
Suspended solids concentration before sterilisation(g/L)	5.5 ± 0.205	3.5 ± 0.155	4.5 ± 0.103
Suspended solids conc. (g/L)(Treated at pH 2)	2.1 ± 0.105	2.35 ± 0.1175	2.85 ± 0.14
Suspended solids conc. (g/L) (Treated at pH 7)	4.05 ± 0.2025	2.95 ± 0.1475	3.6 ± 0.18
Suspended solids conc. (g/L) (Treated at pH 12)	2.3 ± 0.115	2.85 ± 0.1425	3.4 ± 0.17

Table 3: Carbohydrate determination by LC-MS-MS after substrate pre-treatment at different pH values

Carbohydrate	glucose mg/L	Fructose mg/L	Lactose mg/L	Sucrose mg/L	Galactose mg/L	Xylose mg/L
Anaerobically digested sludge pH 2	390	<4	<4	<4	<4	5
Anaerobically digested sludge pH 7	<4	<4	<4	<4	<4	<4
Aerobically digested sludge pH 2	12	<20	<20	<20	<20	11
Aerobically digested sludge pH 7	<4	<4	<4	<4	<4	<4
SIW pH 2	380	310	<20	<20	150	320
SIW pH 7	170	320	<20	20	110	140

Table 4: Physical parameters of the different substrates studied before fermentation

Physical parameters	Viscosity (mPas)	Particle size (D 50 : μm)	Zeta potential (mV)
SIW	14 \pm 0.7	1.5 \pm 0.12	16.38 \pm 1.47
Aerobically digested sludge	31.9 \pm 1.6	2.5 \pm 0.2	-34 \pm 3.06
Anaerobically sludge	33.99 \pm 1.7	2.1 \pm 0.17	-37 \pm 3.33
SIW (treated at pH 2)	10 \pm 0.5	1.2 \pm 0.096	-11.26 \pm 1.013
Aerobically digested sludge (Treated at pH 2)	25 \pm 1.25	2.1 \pm 0.17	-30 \pm 2.7
Anaerobically digested sludge	27	1.8	-35

(Treated at pH 2)	± 1.35	± 0.14	± 3.15
SIW fortified with 15 g/L aerobically digested sludge (Treated at pH 2)	50 ± 2.5	2 ± 0.16	-27 ± 2.43
SIW fortified with 15g/L anaerobically digested sludge (pre-treated at pH 2)	42 ± 2.1	1.9 ± 0.15	-23 ± 2.07
SIW fortified with 15g/L of centrifuged solids of SIW (pre-treated at pH 2)	30 ± 1.5	1.6 ± 0.13	-18.4 ± 1.65
SIW fortified with 30g/L of aerobically digested sludge (pre-treated at pH 2)	73.98 ± 3.7	2.2 ± 0.18	-32.08 ± 0.28
SIW fortified with 30g/L anaerobically digested sludge (pre-treated at pH 2)	85.98 ± 4.3	1.9 ± 0.15	-20.75 ± 1.86
SIW fortified with 30g/L of centrifuged solids of	25.99	1.7	-17.9

SIW (Treated at pH 2)	\pm 1.3	\pm 0.14	\pm 1.61
--------------------------	--------------	---------------	---------------

Table 5: Formulation composition for 100L volume

Additives	Amount
Centrifuged slurry (L)	60
Propionic acid (L)	0.07
Ascorbic acid (kg)	0.01
Carboxymethylcellulose (kg)	0.15
Sorbitol (kg)	1
Xanthan Gum (kg)	0.2
Molasses (kg)	0.3
Potassium silicate (kg)	0.25
Sodium acetate (kg)	1.7
Acid acetic (L)	0.25
Fermented broth (L)	36

Table 6: Entomotoxicity of different formulation prepared from fermented broths of different substrates

Substrates	Entomotoxicity UI/ μ L
SIW	18 500 \pm 1480
Aerobically sludge	14 500 \pm 1160
Anaerobically sludge	15000 \pm 1200
SIW (Treated at pH 2)	21 000 \pm 1680
Aerobically sludge (Treated at pH 2)	15 500 \pm 1240
Anaerobically sludge (Treated at pH 2)	16 500 \pm 1320
SIW fortified with 15g/L aerobically sludge (Treated at pH 2)	19 500 \pm 1560
SIW fortified with 15g/L anaerobically sludge (treated at pH 2)	20 000 \pm 1600
SIW fortified with 15g/L SIW (treated at pH 2)	21 500 \pm 1720
SIW fortified with 30g/L aerobically sludge	20 000 \pm 1600

(treated at pH 2)	
SIW fortified with 30g/L anaerobically sludge (treated at pH 2)	20 500 ± 1640
SIW fortified with 30g/L SIW (treated at pH 2)	22 500 ± 1800
Foray 76B	20 000 ± 1600

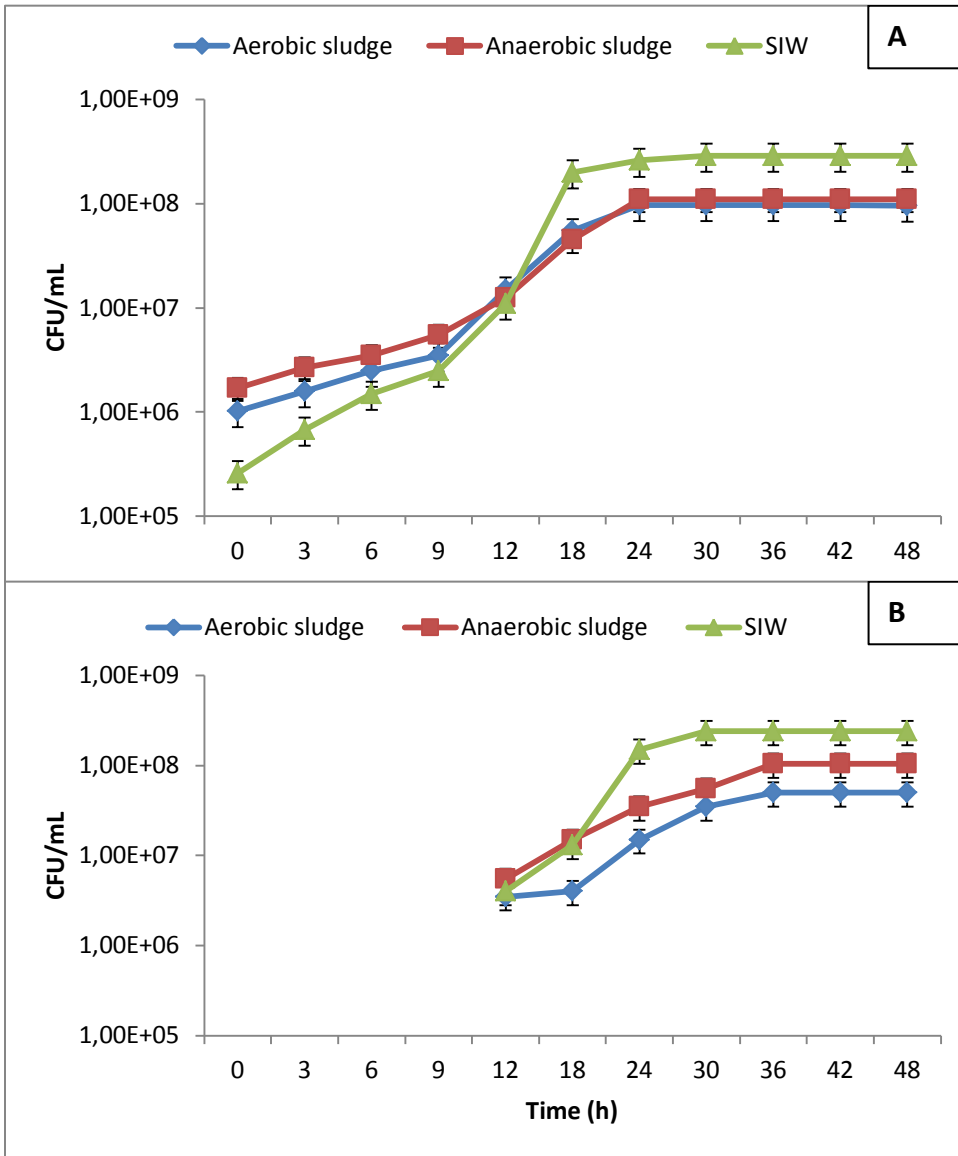


Figure 1: Btk growth profile employing aerobically digested sludge, anaerobically digested sludge and SIW: a) total cell count b) viable spores count

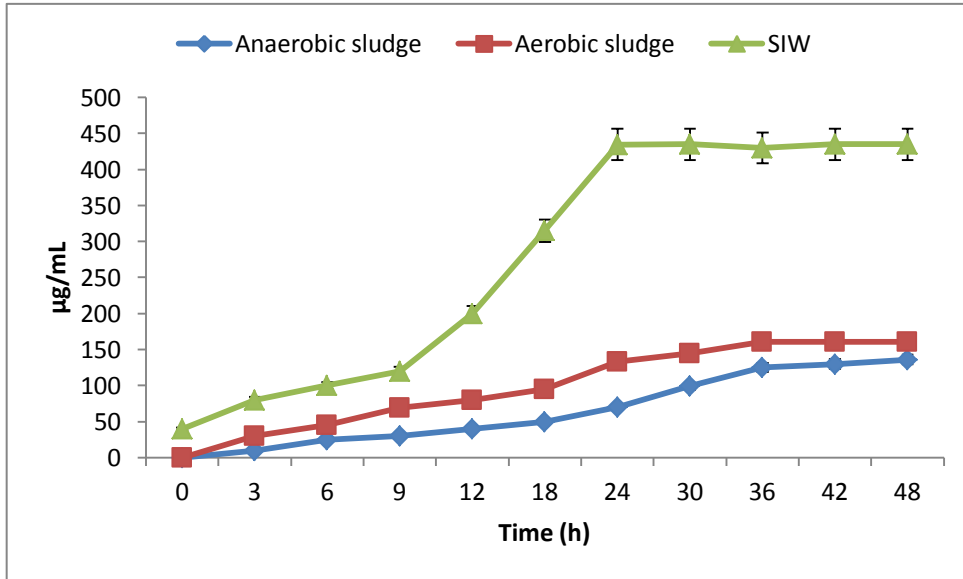


Figure 2: Btk endotoxin synthesis profile employing anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW.

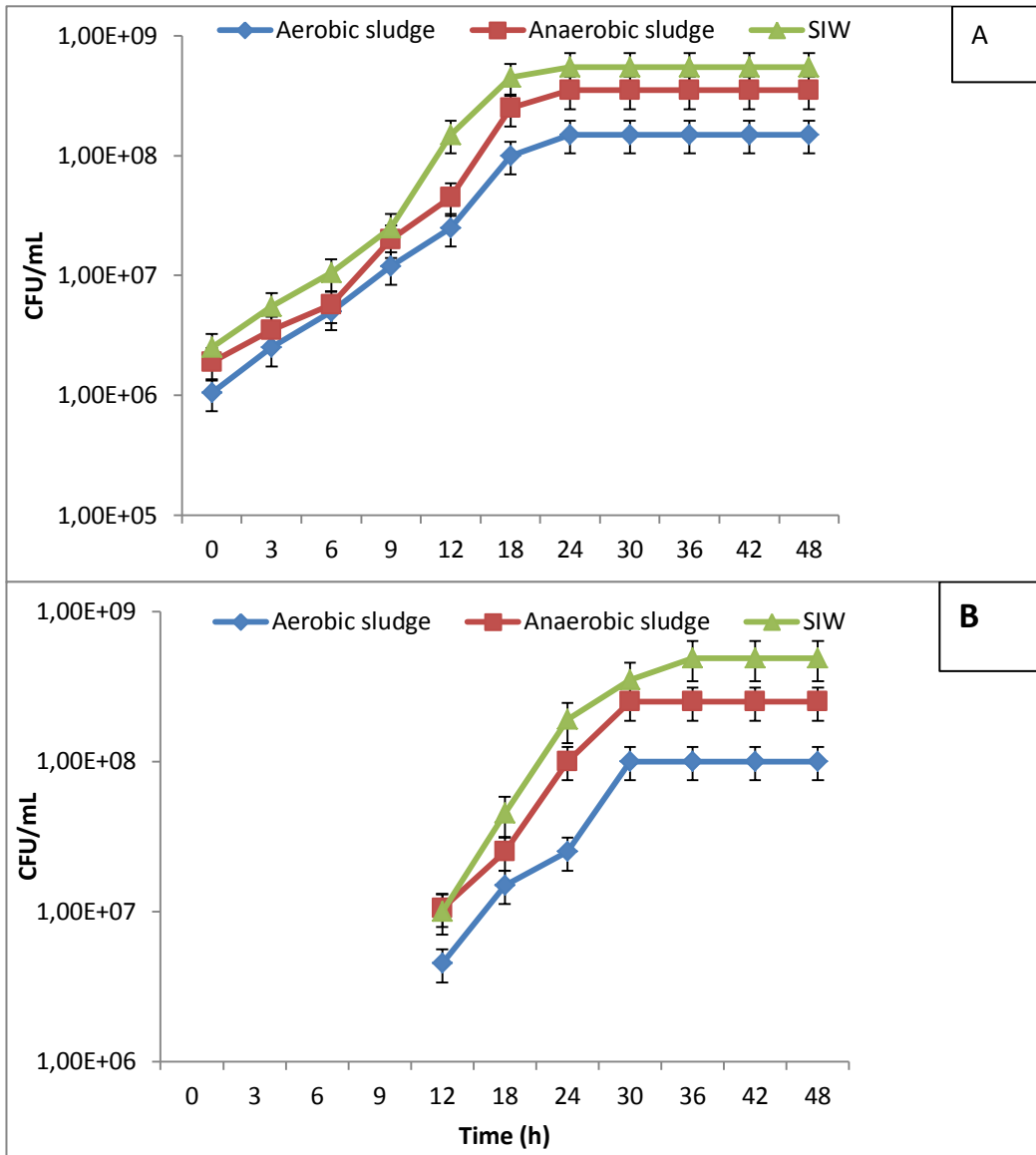


Figure 3: Btk growth profile from anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2: a) total cells count b) viable spores count

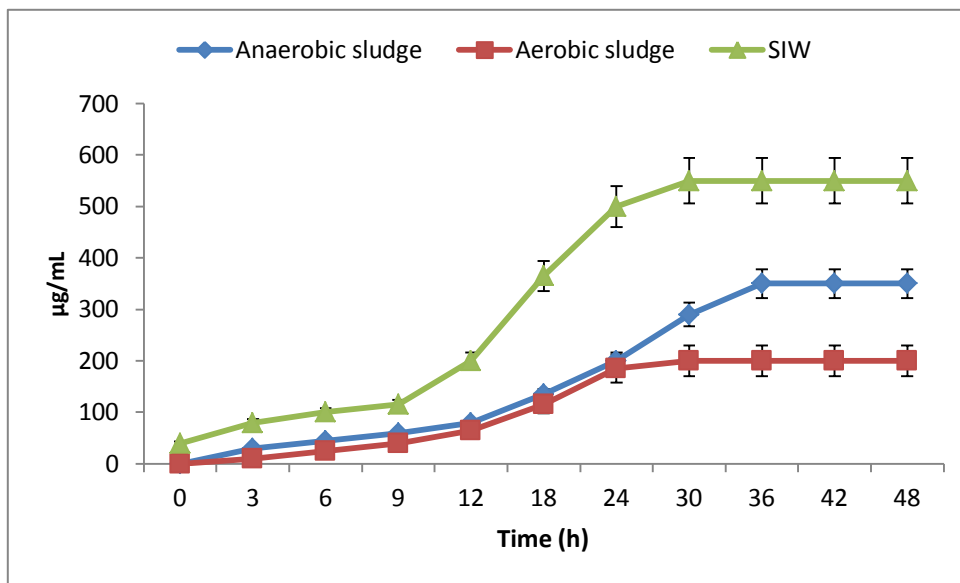


Figure 4: Btk endotoxin synthesis profile employing anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2

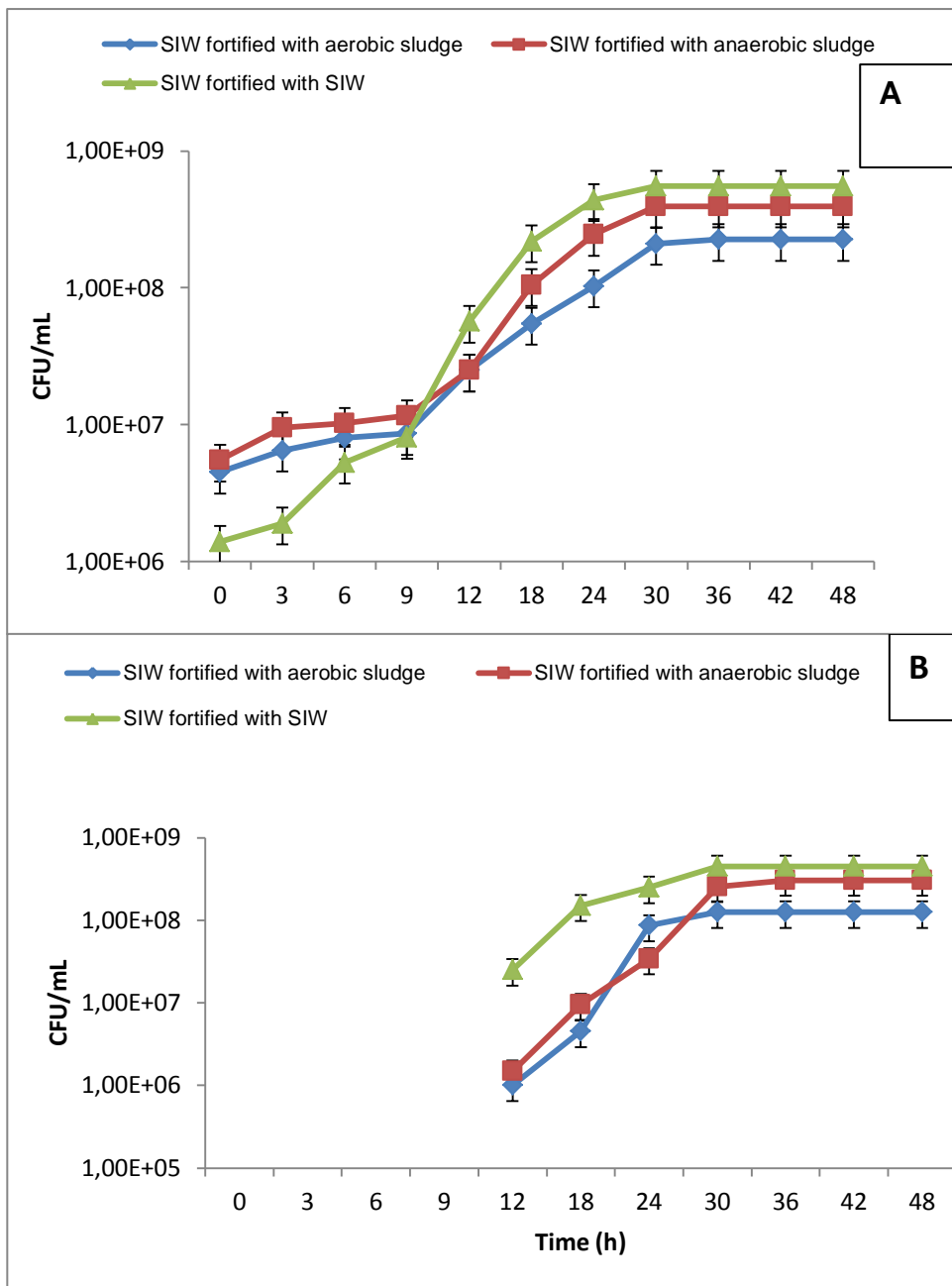


Figure 5: Btk growth profile employing SIW fortified with 15g/L of anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW pre-treated at pH 2 a) total cells b) viable Btk spores.

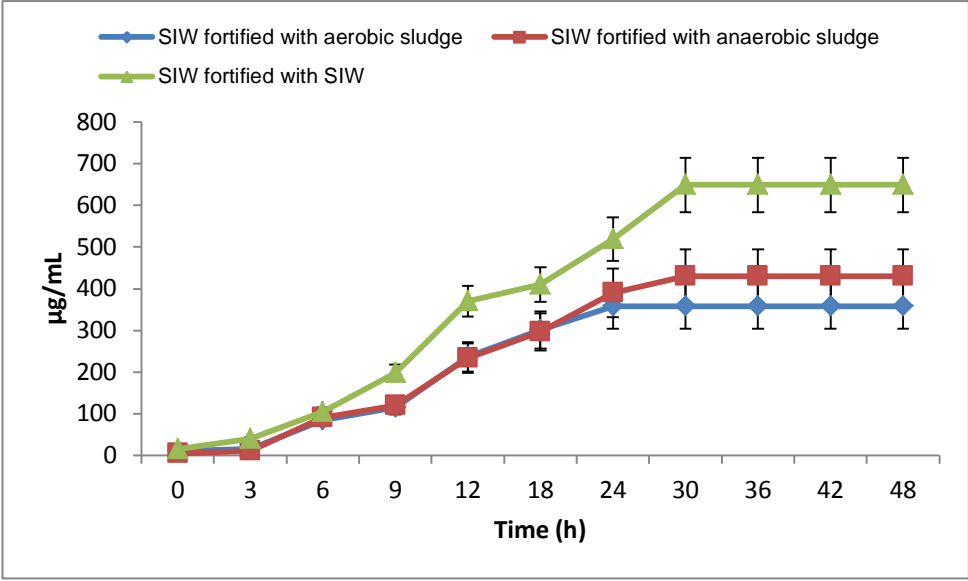


Figure 6: Btk endotoxin synthesis profile using pre-treated SIW and fortified with 15g/L of anaerobically digested sludge or aerobically digested sludge.

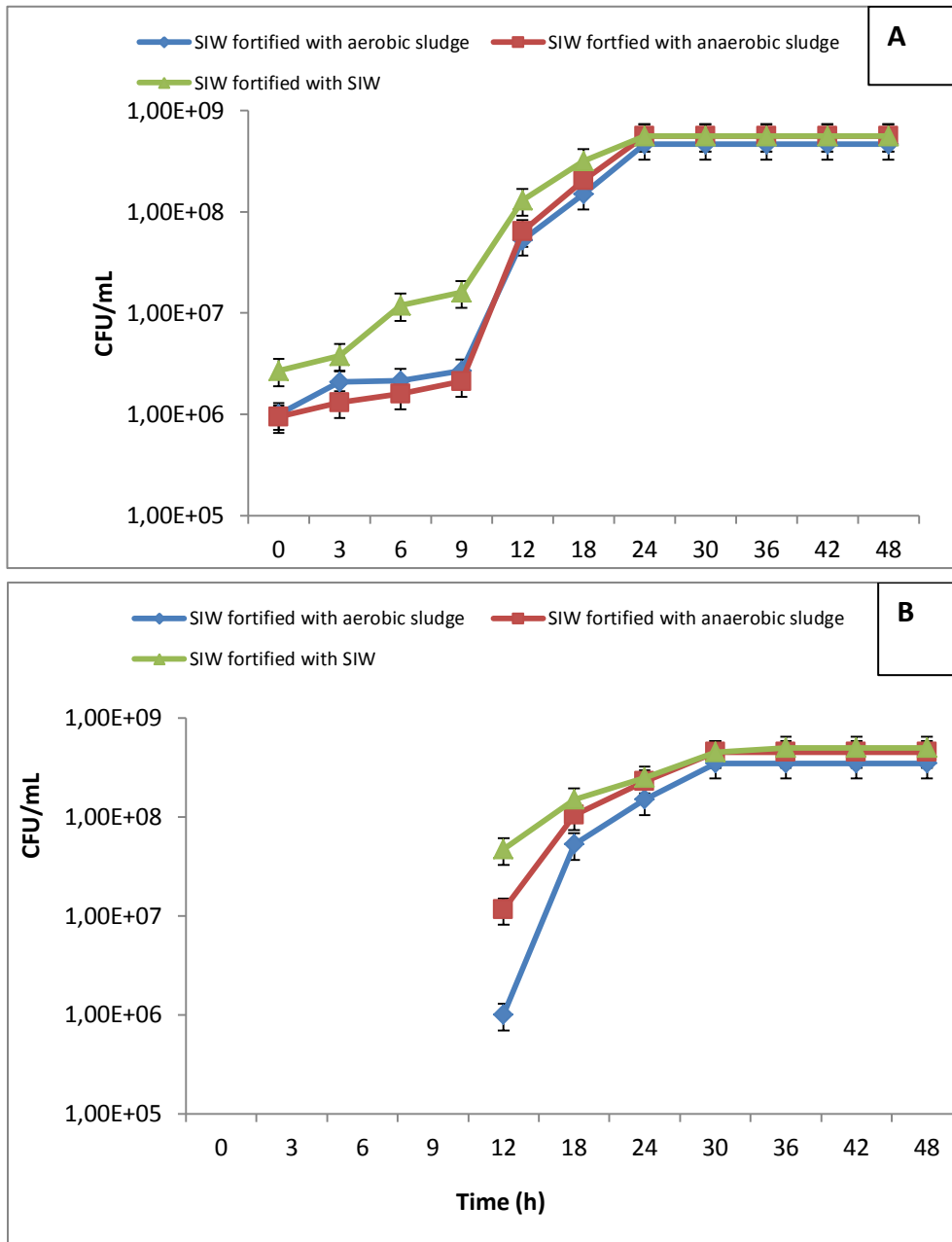


Figure 7: Btk growth profile using pre-treated SIW at pH 2 and fortified with 30g/L of anaerobically digested sludge or aerobically digested sludge and SIW a) total cells b) viable spores.

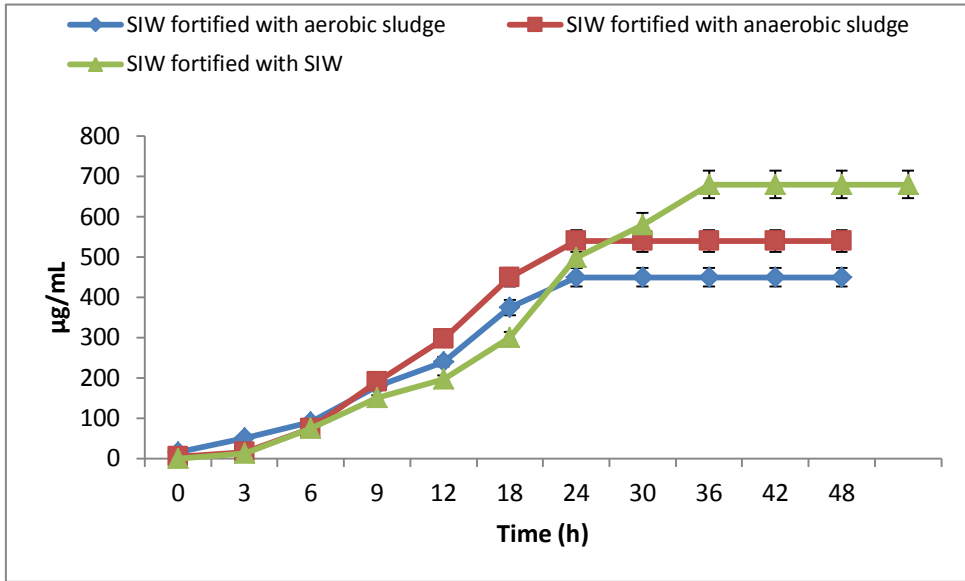


Figure 8: Btk endotoxin synthesis profile employing pre-treated SIW at pH 2 and fortified with 30g/Lof anaerobically digested sludge, aerobically digested sludge and SIW

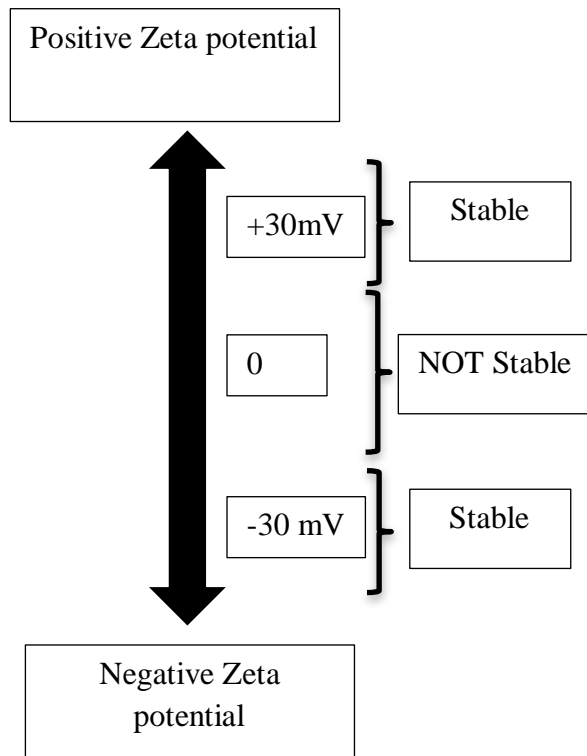


Figure 9: Zeta potential (mV) and colloid stability

Recovery of Btk cells, spores, and toxin with the aid of coagulants and flocculants

A. Ndao, RD Tyagi, J.R. Valéro

Abstract

Flocculation results (jar test) of fermented broth collected after 48 hours of *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) fermentation using starch industry wastewater (SIW) and SIW fortified with soybean semi-synthetic medium exhibited a significant flocculation activity at pH 5 at respective concentrations of 150mg/L (for SIW), 800mg/L (for SIW fortified soybean) and 300 mg/L (for SIW & SIW fortified soybean) of chitosan. A significant reduction of total cells (for SIW - 2.1×10^2 CFU/mL; for SIW fortified soybean - 1.8×10^2 CFU/mL) and viable spores (for SIW - 1.5×10^2 CFU/mL; for SIW fortified Soybean - 1.2×10^2 CFU/mL) were measured in the supernatant when these flocculants were associated with batch centrifugation (jar test experiment). When centrifugation was operated above 20,000 rpm, the flocculation was observed which was characterized by a high total cell count, viable spores and high protein crystals in supernatant compared to 15,000 rpm. This flocculation technique was combined with continuous centrifugation at pilot scale to validate the results. Comparative results between control and flocculating formulations show the presence of important active ingredients in 2nd formulation. In addition, entomotoxicity determined after centrifugation-flocculation followed by formulation provided high entomotoxicity in the flocculated products. These results can be used to assess the downstream integration of coagulant and organic flocculant (biodegradable) associated with centrifugation in order to optimize the biopesticide's larval potency.

Introduction

Biopesticides (microbial, fungi, parasites, etc.) accounted for 2.5% of total pesticide market in 2005 (Thakore, Yatin 2006). A study reported 1% market share of biopesticides in 2004 (Ann Hajeck, 2004). The market share of biopesticides dominated by *Bacillus thuringiensis*-based formulations is slowly but steadily increasing. This expansion, although small, is due to a greater ecological sensitivity of populations, authorities and also of farmers whose portion is increasingly engaged in organic farming (Lichtfouse et al. 2009; Pretty, 1995). Moreover, *Bacillus thuringiensis* formulations efficiency (liquids, solids or powders) with no detrimental effect on the environment is of interest to industrialists (Gardener and Fravel, 2002). However, chemical pesticides are still the preferred approach of protecting crops despite their adverse effects on human health and their lack of specificity against pests. This situation can be explained by expensive cost production of biopesticides such as *Bacillus thuringiensis* formulations (Hynes and Susan, 2006). During their formulation, concentration steps (centrifugation, etc.) are required because of low concentration of total cells count, viable spores count, endotoxin concentration and other virulence factors (Vips, chitinase etc.) in the fermented broth (Ndao et al. 2017; Brar et al. 2005). The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Btk) against Lepidoptera larvae is due to the concomitant action of these different compounds produced during the stationary or exponential phase during the growth of the bacterium (Crickmore, 2006; Valero, 1990).

Among the advanced methods, which have been employed to recover these active compounds, are ultrafiltration, microfiltration, nanofiltration, vacuum filtration, and centrifugation (Adjalle et al. 2009; Tzeng and Chang, 1999). The latter method was selected as studies had proven its viability (Wong and Middelberg, 1996; Brar et al. 2006). However, results obtained during the formulation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* biopesticide from starch wastewater revealed losses of significant concentration of total cells, viable spores, endotoxin and enzymes in supernatant (part not taken in the formulation of the product) (Adjalle et al. 2009). Thus, a study on coagulation-flocculation as a centrifugation aid has been proposed. Coagulation-flocculation processes are considered easy, efficient and economical (Choi et al. 2001; Chu, 2001; Kacha and Elmaleh, 2003; Kim et al. 2004; Zemaitaitiene et al. 2003).

The bacterial cell surface is in direct contact with its external environment and it is involved in all kinds of interactions with surfaces and interfaces. Structural and functional

properties of the cell surface reflect its heterogeneous composition. The combination of the different molecules and structures imparts the characteristics and physicochemical properties such as cell surface charge to any particular bacterium (Besra et al. 1998; Bansal and Hiroshi, 2014). In an electrolyte solution, the charge on the surface is balanced by the counter ions, whose distribution around the surface is not uniform and gives rise to an electric double-layer. The double-layer forms spontaneously by two opposing forces: electrostatic attraction tending to localize the counter ions close to the particles (coulombic forces) and the tendency of ions to diffuse randomly through the solution. Thus, flocculation of particles such as bacteria or ions may be caused by any of the following mechanisms or their combination: double layer compression, charge neutralization, bridging and colloid entrapment. (Moss and Dymond, 1978; Vedoy and Joao, 2015).

The choice of flocculants also led to environmental and efficiency considerations. Inorganic salts (aluminum chloride or aluminum sulfate) are regularly used as coagulants in the treatment of sewage treatment plant wastewater. However, controversies related to the possible involvement of aluminium in Alzheimer's disease and the corrosion generated by it on board aircraft involved in spreading do not allow the use of this type of coagulant (Gnepe et al. 2014; Winship, 1993). Also, the effect of polyacrylamide (flocculant) capable of generating carcinogenic monomers has led to the orientation of this work on biocoagulants and bioflocculants such as chitosan and tannic acid.

Chitosan is a biocoagulant-flocculant that has been the subject of numerous studies over the past 30 years on metal ion sorption and wastewater treatment; Bratskaya et al. 2002; Divakaran and Pillai, 2002; Huang et al. 2000; Roussy et al. 2004; Strand et al. 2002; Strand et al. 2003). Chitosan is a polycationic polysaccharide obtained by deacylation of chitin. The presence of these positively charged amino groups in solution and its high molecular weight give it its flocculation and coagulation properties (Pan et al. 2011).

Tannic acid is a low molecular weight polymer of gallic acid and 3 galloygallic acid esterified with glucose. It is a family of hydrolysable tannins that are widespread in nature (Özacar and Sengil, 2003; Özacar and Sengil, 2000). This biopolymer has attracted the attention of several researchers in recent years for its anionic potential in solution of hydroxyphenyl groups capable of generating links with heavy metals such as cobalt, chromium

and iron (Yamaguchi et al. 1992; Nakajima and Sakaguchi, 2000; Nakano et al. 2001). This anionic potential is thus interesting to exploit in a solution containing positively charged chitosan.

The aim of this study is to use properties of these biopolymers (chitosan and tannic acid) as centrifugation aid for the recovery of active ingredients produced by Btk and lost in the supernatant during centrifugation.

Materials and methods

Bacterial strain

The Btk strain was procured from Cederlane Laboratories INC (4410 Paletta Court, Bullington, ON, Canada, L7L 5R2). The Btk strain was cultivated and sub-cultured on tryptic soy agar (TSA) at 30°C for 12 h. The grown pure bacterial culture was stored at 4°C for inoculum preparation.

Experimental procedure

The culture medium starch industry wastewater (SIW) for Btk fermentation was obtained from ADM (155 Avenue d' Iberia, Candiac, QC J5R 3H1), a cornstarch production industry. The composition of this medium, analysed by ICP-AES axial Vista, is presented in Table 1. SIW contains dissolved organic carbon of 4990 mg/L and dissolved nitrogen of 460mg/L, which are necessary for the growth of Btk. The SIW with pH 3.5 (as received) was stored in the cold room at 4°C until it was used. Its shelf life was just under two months. The SIW used as culture medium was also supplemented with a 25% (w/v) soybean medium to further enrich the medium with carbon and nitrogen for optimal Btk proliferation (Table 2)

Inoculum production

The Btk strain stored at -80°C was spread on agar (TSA) and placed in an incubator at 30°C for 24 hours. A pure colony of Btk was inoculated into a 150 mL erlenmeyer flask containing 40 mL of SIW media (pre-sterilized at 121°C for 15 minutes) at pH 7, stirred at 200rpm for 9 hours at 30°C. At the end of this first culture stage, the medium was transferred (2% v/v) to a 4 L erlenmeyer flask containing 2 L of SIW medium and was fermented under the same operating conditions for 9h.

Fermentation process

After 9 hours, the pre-culture was used as an inoculum (2L) for 150L bioreactors containing 100 L of SIW or 100 L SIW fortified with 25% soybean medium. Production of btk was conducted for 48 hours at pH 7 and a temperature of 30°C. Dissolved oxygen was maintained above 30% during the exponential growth phase by controlling agitation and aeration. During the sporulation phase, 18h-36h, dissolved oxygen was maintained at 50%. At the end of fermentation, pH of the fermented broth was reduced to 4.5 to avoid solubilization of proteins by the active proteases at basic pH (Yezza et al. 2004). Samples were collected every 3 hours during the first 12 hours of fermentation and every 6 hours until 48 hours.

For the production of formulation, fermented broths of the SIW and SIW medium fortified with(25%) soybean were centrifuged to concentrate the active ingredients in the centrifuged slurry (continuous centrifuge) or pellet (batch centrifuge). In continuous centrifugation (GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477 15000g x 11800rpm), a slurry was obtained as well as supernatant, which was not taken into account in the biopesticide formulation processes and usually discarded. A significant portion of the endotoxins in fermented broth is lost in supernatant (Figure 1). This loss of active ingredients significantly affects the biopesticide's entomotoxicity.

Test of chitosan as coagulant and flocculant

To minimise the loss of active ingredients in supernatant during centrifugation, the experiments for Btk active ingredients recovery were carried out in standard jars tests (Nouha et al. 2016) using beakers of 1L volume. Each beaker contained 500ml of the fermented broth. The chitosan (Sigma Aldrich 448869-250G) was first coagulant flocculant to be tested. It was first solubilized in 0.1M acetic acid solution. Volumes of chitosan, depending on the final concentration of chitosan in the solution (0, 50,100,150,200,400,700 mg/L), were added directly to the beaker containing Btk fermented broth. The pH of the solution in beaker was then adjusted to 7 or 5 by adding hydrochloric acid (0.1M) or sodium hydroxide (0.1M). Then, a vigorous stirring was carried out at 200rpm for 2 minutes. This was followed by less vigorous stirring at 30 rpm agitation for 20 minutes and the solution was allowed to settle for 20 minutes.

Test of combination of chitosan and tannic acid as coagulant and flocculant

In the first set of experiments, the tannic acid as flocculant, (Fisher scientific A310-500) was added after solubilization of chitosan as described above and stirring at 200rpm for 5 minutes in a beaker containing 500mL of fermented broth was conducted. The volumes of tannic acid solution corresponding to the desired concentrations (150,300,600,900 mg/L in the final solution) were added in the solution to be treated. The pH was then raised (NaOH 0.1M) if necessary or reduced (HCl 0.1M) to 5 or 7. Then, an agitation of 80rpm for 30 minutes was carried out and the solution was allowed to settle for 20 minutes.

In another set of experiments, chitosan followed by tannic acid was added as described above, but before the settling stages, samples from the experiments was subjected to centrifugation (Sorvall RC5c plus superspeed) at different rpm (9000, 10000, 15000, 20000 rpm). The supernatant was collected from both set of experiments, and the following analysis were performed: total cells count (CFU/ml), viable spores count (CFU/ml), turbidity (NTU), particle size (μm) and protease activity (IU/ml). The endotoxin concentration was analyzed using settled phase (in case of first set of experiment) and pellet collected after centrifugation (second set of experiments).

After optimizing concentration of chitosan (0.15g/L SIW - 0.8g/L soybean fortified SIW) and tannic acid (0.3g/L SIW - 0.4g/L soybean fortified SIW) in jar test, continuous centrifugation on pilot scale (GEA GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477 15000g x 11800rpm) was studied.

Estimation of Biological parameters

Total cell count and viable spore count

Total cell and spore counts were determined by counting bacterial colony forming units (CFU) on TSA (Tryptic Soy Agar) plates. All the CFU counts were obtained from the average value of experiments conducted in triplicates. For total spore count, serially diluted samples were placed in a water bath (Buchler Instruments) at 80°C for 10 min and immediately immersed in ice for 10

min. Then, 0.1 mL of diluted sample was plated on TSA medium and incubated at 30°C for 24 h (Imperial II Incubator oven). The presented values are the mean of three separate experiments \pm standard deviation (SD).

Endotoxin estimation

Btk produces cry toxins encoded by different cry genes found on Btk plasmids. Those cry toxins consists of parasporal inclusions, which contains crystal proteins or endotoxins. They have a large spectrum of action against larvae of Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera (Schnepf et al. 1998). Endotoxin concentration was determined based on the solubilization of cry protein under alkaline conditions (Zouari and Jaoua 1999). One mL of each sample collected at the end of the settling experiment or centrifuged pellet was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The pellet containing the mixture of spores, crystal proteins, and cell debris was used to estimate the soluble insecticidal proteins (delta-endotoxin) in alkaline medium. The pellets were washed thrice with 1 mL of 0.14 M NaCl and 0.01 % Triton X-100 solutions. This washing step aids in the removal of soluble proteins and proteases, which might stick to the centrifuged pellets and affects the integrity of the crystal proteins (Vu et al. 2009). The pellets of crystal proteins were dissolved in 0.05 N NaOH (pH 12.5) for 3 hours at 30°C. After crystal solubilization, the suspension was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C, and the pellet containing the spores and cell debris were discarded. The supernatant containing the insecticidal crystal proteins was used to determine the concentration of delta-endotoxin by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a protein standard (MM Bradford 1976). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Protease activity

Protease activity (PA) was determined according to modified Kunitz (1947) method. A part of the supernatant (in triplicate) was appropriately diluted using borate buffer at pH 8.2 \pm 0.1. PA was assayed by incubating 1 ml of enzyme solution with 5 ml casein for 10 min at 37°C in a constant-temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 ml 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min to precipitate the complete nonhydrolyzed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein (casein was inactivated by using TCA followed by incubation). At the end of the incubation period, samples

and blanks were filtered through Whatman 934-AH paper. The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm. One PA unit was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 μmol (181 μg) tyrosine from casein per minute in pH 8.2 buffer at 37°C. The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Entomotixicity bioassay

The entomotixicity (Tx) of the samples was measured by bioassay for the relative mortality of eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray76 B (Abbott Labs, Chicago, U SA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU) (Dulmage 1970). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented SIW samples using spruce budworm larvae.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method. In this technique 1.5mL of serially diluted sample was mixed into 30 mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL- in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to check the mortality of larvae due to the starch industry wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The presented values represent the mean of three determination of three independent experiments \pm SD (Table 4).

Physical parameters

Particle size

Particle size analysis was carried out using a Horiba laser scattering particle size analyzer (LA-950), to produce a particle size distribution. The stirrer and recirculation pump speed were kept at 250 and 500 rpm to minimize the breakage of flocculated particles. For analysis, each sample was diluted approximately 400 times and each sample was analyzed 3 times to confirm the validity and reproducibility of the results. The method was based on the principles of Fraunhofer

diffraction and Mie scattering. The results were then averaged to obtain the particle size distribution between 0.1 to 1000 μm .

Zeta potential

Zeta potential (ζ) of each collected sample was analyzed using Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000 (CAD instrumentation France). The zeta potential values were obtained from an average of 3 measurements. The average values are presented with its half-width confidence interval at 95% confidence level.

Turbidity

Fermented broth turbidity is a function of the concentration of Btk cells, spores, endotoxins and SIW suspended solids. Turbidity was measured by utilizing a Macro 100 Turbidimeter (de Scientific Inc., FL, US) with interval of measurement varying from 0 to 1000 NTU at 720 nm. The presented values represent the mean of three samples of three independent experiments \pm SD.

Formulation

The fermented broth was centrifuged using a batch centrifuge (Sorval RC5c plus superspeed) and a continuous centrifuge ((GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477 15000g x 11800rpm) before the concentrated slurry was recovered. To obtain a low viscosity of the concentrated product and to facilitate easy field application, the fermented broth (after 48 h fermentation) and chemical additives were added to the centrifuged slurry. The ingredients additives were prepared separately. They were used as follows; carboxymethylcellulose (emulsifier, stabilizer), Xanthan gum (provides better adhesion to the foliage), molasses (adhesion, UV protectant, and phagostimulant) and potassium silicate (combined with sodium acetate buffer). The homogenized ingredients in the fermented broth were mixed with antimicrobial compounds like propionic acid, sorbic acid and acetic acid. The mixtures of additives, fermented broth and the centrifuged slurry were homogenized in a large vessel equipped with a stirrer (200 rpm) (Caframo stirrer type RZR50). The pH of the formulated product

obtained was 5. It was collected in sterilized bottles. Its entomotoxicity potential was measured. The final product was stored under sterile conditions (Table 3).

Results and discussion

Btk Fermented broth was characterized by 6 g of suspended solids, 3.5×10^8 CFU/mL of total cells count, 2.95×10^8 CFU/mL of viable spores count, 480 µg/mL of endotoxin concentration and 3 IU/mL of protease activity. While fermented broth of SIW medium fortified with 25% soybean was characterized by 9.5g/L of suspended solids, 1.65×10^9 CFU/mL of total cells count, 1.35×10^9 CFU/mL of viable spores count, 1170 µg/mL of endotoxin concentration and 4.5 IU/mL of proteases activity.

Treatment of the fermented broth with Chitosan at different pH (Neutral and acidic pH)

Chitosan was added to the fermented broth at different pH - neutral (7) and acidic (5). At alkaline pH, the activity of Btk metalloprotease leads to the solubilization of endotoxins (Brar et al. 2006). Thus, flocculation tests could only be carried out on pH values 7 and 5. Results showed that at neutral pH (7), 400 mg/L to 700 mg/L of chitosan concentration could significantly reduce turbidity of the supernatant (105NTU; 211NTU control), increased zeta potential of the supernatant (-35.6 mV; -56.78mV control) and increased particle size (145µm; 119.6 µm control) as compared to the fermented broth without addition of chitosan or the control (Fig 2). Whereas at acidic pH (5), 150mg/L of chitosan concentration added to the fermented broth caused a sharp drop in turbidity (55NTU; 200NTU control) of the supernatant, increased the zeta potential (-9.7 mV; -46mV control) and increased the particle size (180µm; 120µm control) as compared to the chitosan-free fermented broth or control (Fig 2, Table 4). Increase in zeta potential value at acidic pH showed that chitosan even at low concentration (150mg/L) can act as a coagulant and leads to a better compression of the colloid double layer through positive charges of the amino groups (described by the double layer theory Derjauin, Landau, Verwey, and Overbeek: DLVO) by totally or partially neutralizing the negative charges on these particles. As a result, van der waals interactions becomes predominant, allowing aggregation of suspended fine particles and subsequent flocculation (Grasso et al. 2002; Nir, 1977; Verwey et al. 1955). Increase in the concentration of chitosan from 150 mg/L to 700 mg/L at acidic pH, the zeta potential (-30mV) decreased while turbidity increased (125NTU). This is due to the fact that

an increase in positive charge brought by chitosan breaks the pre-established equilibrium and creates a new positive charged double layer around the colloids leading to a low coagulation (Fig1). However, a large particle size (Table 4) (281 μ m) at 400 and 700mg/L at pH 5 shows that different groups present in the structure as well as the high molecular weight of chitosan are sufficient to create bridges between chitosan and colloids present in the medium (Csempezs, 2000; Crini and Badot, 2008). This phenomenon could explain the similar results observed at neutral pH where aggregation between particles is more important due to bridging bonds between chitosan (high molecular weight) and the different molecules in solution (Crini and Badot, 2008).

The jar test results of fermented broth of SIW fortified with soybean semisynthetic medium showed a significant flocculation activity at 800 mg/L of chitosan concentration at pH 5 (Table 5). The presence of increased solid particles from the soybean medium and Btk active ingredients leads to a low flocculation activity indicated by high turbidity of supernatant at low levels of chitosan. Thus, at 800 mg/L of chitosan, turbidity (75 NTU, 330 NTU control), zeta potential (-10 mV; -30 mV control) and particle size (180 μ m; 85 μ m control) were strongly affected when compared to the control.

At acidic pH 5, addition of chitosan to the fermented broth resulted in 2 log cycle reduction of total cells count (SIW- 4.4×10^3 CFU/ml; SIW fortified with soybean medium 6×10^4 CFU/ml, control- 1×10^6), viable spores (SIW- 3.2×10^3 CFU/mL; SIW fortified with soybean medium- 5.5×10^4 CFU/mL, control 8.5×10^5) in the supernatant when compared to the control and neutral pH (Fig. 3a, Table 5). However, the concentration of endotoxins recovered in the settled phase was not significant at acidic pH (SIW 470 μ g/mL; SIW fortified with soybean medium 1160 μ g/mL) when compared to the control (SIW 440 μ g/mL; SIW fortified with soybean medium 1150 μ g/mL) (Fig 3b, Table 5).

The results showed that batch centrifugation (at 15,000 rpm) of the fermented broth fortified with chitosan at pH 5 showed a reduction of one log cycle in the cell count (3.2×10^2 CFU/mL; SIW fortified with soya medium 1.10×10^3 CFU/mL) and viable spores count (2.4×10^2 CFU/mL; SIW fortified with soya medium 7.5×10^2 CFU/mL) in the supernatant. The endotoxin concentration in the pellet increased from 4480 μ g/mL to 7950 μ g/mL after addition of chitosan followed by centrifugation for SIW based fermented broth (Fig 4b, Table 5). However, when rpm increased

from 10 000 to 20 000, turbidity, total cell count and viable spores count in the supernatant, and endotoxins in the pellet were affected. It seemed that the flocs formed by chitosan did not resist a centrifugal force above 10,000 rpm.

Impact of chitosan and tannic acid at neutral and acidic pH 5

Flocculation results showed that chitosan could act as a coagulant and flocculant at acidic pH. However, when chitosan was used alone, the flocs did not resist high centrifugal force while the particles size determined were not large enough to result in rapid and significant settling.

Association between chitosan (400mg/L) and different tannic acid concentrations (150 to 900mg/L) at pH 7 indicated a significant flocculation due to an increase in zeta potential (-30mV; -60mV control) of the fermented broth, a reduction in supernatant turbidity (95NTU; 210 NTU control) and an increase in particle size (180 μm ; control (without tannic acid and chitosan) 115 μm) (Fig 5). At pH 5, chitosan concentration of 150 mg/L was used. Varying the tannic acid concentration showed that 500mg/L exhibited a significant increase in zeta potential (-9mV; -50mV control), a substantial reduction in turbidity (75 NTU; 200NTU control) and a very large particle size (295 μm ; 120 μm control) (Fig 5, Table 6). These results corroborate the chitosan effect at acidic pH on flocculation through the positive charges allowing the compression of the double charge of colloids and particles coagulation. In addition, the attraction generated between negatively charged tannic acid and positively charged chitosan as well as the presence of hydrogen bonds between tannic acid groups (hydroxyl, hydroxyphenyl groups) and protein peptides in solution allowed the formation of broad and compact flocs (295 μm ; control 120 μm) (Zhou et al. 2008). The results led to an efficient settling operation reducing the turbidity in the supernatant of the settled fermented broth (75NTU; 200NTU control). The flocculation observed due to combined impact of chitosan and TA resulted in a significant reduction of total cells count (2.5×10^3 CFU/mL; control 3.1×10^5 CFU/mL), viable spores count (2.1×10^3 CFU/mL; control 2.9×10^5 CFU/mL) in the supernatant and a comparatively higher concentration of endotoxins (480 $\mu\text{g/mL}$; control 440 $\mu\text{g/mL}$) (Fig 6a, b).

Experiments at the jar test using fermented broth of SIW fortified with soybean medium showed similar trends of the results at acidic pH 5. There was a significant reduction of total cells count (1.2×10^3 CFU/mL, control 1×10^6 CFU/mL), viable spores count (3.1×10^2 CFU/mL, control 8.5×10^5 CFU/mL), turbidity (50 NTU; control 210 NTU) in supernatant at 800 mg/L of chitosan (CH)

and 500 mg/L of tannic acid (TA) when compared to the control (Table 7). Also, the concentration of endotoxins (1290 µg/mL, control 1140 µg/mL,) in the settled fraction was significant when chitosan and tannic acid were added to the fermented broth. In fact, particle size (295 µm, control 120 µm) was also effective and the CH-TA network allowed a substantial reduction of endotoxins in supernatant by cross-linking phenomena.

In addition, when the fermented broths fortified with chitosan and tannic acid was subjected to centrifugation at different centrifugal force, the flocs formed by the CH-TA complex showed greater resistance to centrifugation when compared to the flocs of chitosan alone. At 15000 rpm, total cells count (2.1×10^2 CFU/mL; SIW fortified with soybean 1.8×10^2 CFU/mL), viable spores count (1.5×10^2 CFU/mL; SIW fortified with soybean 1.2×10^2 CFU/mL) was low in supernatant and endotoxins concentration (5500 µg/mL; SIW fortified with soybean 8700 µg/mL) was high in pellet, which shows the effectiveness of flocculation process combined with centrifugation. However, at 20000 rpm, the flocculation process was greatly affected by high centrifugal force due to the fact that cell count and spores count was high in the supernatant (Fig 7a and b, Table 7).

Pilot-scale flocculation activity

Tables 8 and 9 presented the flocculation results associated with continuous pilot centrifugation of fermented broth of SIW and SIW fortified with soybean medium, both treated with chitosan and tannic acid. The results obtained after continuous centrifugation assisted by flocculating agents revealed a higher concentration of total cells count (SIW 4.5×10^9 CFU/mL; SIW+Soya medium 9×10^9 CFU/mL), viable spores count (SIW 3.9×10^9 ; SIW+Soya 8.3×10^9 CFU/mL) and endotoxins (SIW 3500 µg/mL; SIW+Soya 8250 µg/mL) in the final formulation. Moreover, the presence of these active ingredients (viable spores) in supernatants of the two fermented broths underwent a reduction of 1 log cycle and a lower endotoxin concentration was observed in the supernatant when compared to the control formulations (no presence of flocculants). These results corresponded to 6%, 9% and 7% loss in total cells, viable spores and protein crystals respectively in supernatant of SIW fortified with soybean when compared to control without flocculants. On the other hand, SIW medium supernatant underwent losses of 2% of

total cells, 20% of viable spores and 50% of protein crystals when compared to the control without flocculants. These results showed a significant improvement in harvesting process using SIW based Btk fermented broth.

Entomotoxicity

Entomotoxicity determination was carried out after flocculation and centrifugation under optimal conditions, pH 5 and optimal centrifugal forces for the different flocculants studied. The results obtained revealed the entomotoxicity of 17 000 IU/ μ L and 38000 IU/ μ L for SIW control and SIW fortified soybean control, 22450UI/ μ L (SIW) and 43000 IU/ μ L (SIW fortified soybean) for CH-TA flocculants, 21000 IU/ μ L and 39500 IU/ μ L for chitosan agent.

These entomotoxicity results indicate the importance of viable spores, total cells and endotoxins concentration in Btk larvicidal potential. Valero, 1990 indicates that spores and crystals mixture is 4 to 5 times more larvicide than a solution containing one or the other. In addition, the presence of tannic acid in the formulation could be a synergistic effect on the entomotoxicity of Btk. Histopathological observations revealed that the epithelium of the middle intestine of diptera larvae and lepidopteran larvae is mainly affected by tannic acid at concentrations above 2 mM (Rey et al. 1999). Tannic acid is oxidized in the intestine, forms oxygen radicals, which leads to lipid peroxidation of the membrane and may be responsible for the membrane plasma lysis (Barbehenn and Martin, 1995). Tannic acid can also bind to lipid components of cell membranes (De veau and Schultz, 1992), causing a disturbance of membrane function integrity. Also, Btk and tannic acid impact on two different regions of the middle intestine (dark and clear cells) increases the biopesticide virulence containing these two compounds. Tannic acid lesions in clear cells are similar to typical Btk lesions (Rey et al. 1999; Krieg et al. 1983).

Conclusion

Reduction of Btk's active ingredients in the supernatant by coagulation and flocculation was carried out by organic and biodegradable flocculants. Tannic acid and chitosan are composed of long polymeric chains and charges in their structures. These properties lead to interactions with colloidal materials and suspended solids in the floc formation. Chitosan combined with tannic acid led to significant flocculation that effectively recovered Btk's total cells, viable spores and endotoxins. This removal of Btk active ingredients from the supernatant and the larvicidal nature

of tannic acid associated with Btk resulted in high entomotoxicity in the formulations in which tannic acid was present.

Furthermore, when the fermented broth solutions with flocculants were centrifuged, the centrifugal force limits Btk's active ingredients removal from the supernatant. The flocs from chitosan and tannic acid resisted a high centrifugal force than the flocs resulting from chitosan treatment.

Reference

- Adjalle, K. D., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Recovery of entomotoxicity components from *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and sludge: Ultrafiltration scale-up approach. *Separation and Purification Technology*, 69(3), 275-279.
- Bansal-Mutalik, Ritu, and Hiroshi Nikaido. "Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.13 (2014): 4958-4963.
- Barbehenn, R. V., & Martin, M. M. (1995). Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *Journal of Insect Physiology*, 41(4), 303-311.
- Beegle, Clayton C. "Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin." *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*. 1990.
- Besra, L., D. K. Sengupta, and S. K. Roy. "Flocculant and surfactant aided dewatering of fine particle suspensions: a review." *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* 18.1 (1998): 67-103.
- Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1-2 (1976): 248-254.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2005). Starch industry wastewater-based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of economic entomology*, 98(6), 1890-1898.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342.
- BRATSKAYA SY, AVRAMENKO VA, SUKHOVERKHOV SV and SCHWARZ S (2002) Flocculation of humic substances and their derivatives with chitosan. *Colloid J.* 64 (6) 681-685
- Choi, J. H., Shin, W. S., Lee, S. H., Joo, D. J., Lee, J. D., Choi, S. J., & Park, L. S. (2001). Application of synthetic polyamine flocculants for dye wastewater treatment. *Separation Science and Technology*, 36(13), 2945-2958.
- CHU W (2001) Dye removal from textile dye wastewater using recycled alum sludge. *Water Res.* 35 (13) 3147-3152.
- Crickmore, N. "Beyond the spore—past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide." *Journal of Applied Microbiology* 101.3 (2006): 616-619.
- Crini, Grégorio, and Pierre-Marie Badot. "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature." *Progress in polymer science* 33.4 (2008): 399-447.

Csempesz, Ferenc. "Enhanced flocculation of colloidal dispersions by polymer mixtures." *Chemical Engineering Journal* 80.1 (2000): 43-49.

De Veau, EJ Ian, and Jack C. Schultz. "Reassessment of interaction between gut detergents and tannins in Lepidoptera and significance for gypsy moth larvae." *Journal of chemical ecology* 18.8 (1992): 1437-1453.

DIVAKARAN R and PILLAI VNS (2001) Flocculation of kaolinite suspensions in water by chitosan. *Water Res.* 35 (16) 3904-3908.

Dulmage, Howard T. "Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*." *Journal of Invertebrate Pathology* 15.2 (1970): 232-239.

Gardener, B. B. M., and Deborah R. Fravel. "Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA." *Plant Health Progress* 10 (2002).

Grasso, D., Subramaniam, K., Butkus, M., Strevett, K., & Bergendahl, J. (2002). A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(1), 17-38.

Guibaud, Gilles, et al. "Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel." *Chemosphere* 59.5 (2005): 629-638.

Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2014). Corrosion and stability study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* starch industry wastewater-derived biopesticide formulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(11), 889-896.

Hajek, A. E., Strazanac, J. S., Wheeler, M. M., Vermeylen, F. M., & Butler, L. (2004). Persistence of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* and its impact on native *Lymantriidae*. *Biological Control*, 30(2), 466-473.

HUANG C, CHEN S and PAN JR (2000) Optimal condition for modification of chitosan: A biopolymer for coagulation of colloidal particles. *Water Res.* 34 (3) 1057-1062.

Hynes, Russell K., and Susan M. Boyetchko. "Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations." *Soil Biology and Biochemistry* 38.4 (2006): 845-849.

KACHA S, DERRICHE Z and ELMALEH S (2003) Equilibrium and kinetics of color removal from dye solutions with bentonite and polyaluminium hydroxide. *Water Environ. Res.* 75 (1) 15-20

KIM T-H, PARK C, SHIN E-B and KIM S (2004) Decolorization of disperse and reactive dye solutions using ferric chloride. *Desal.* 161 (1) 49-58

Krieg, V. A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A., and Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Z. Angew Entomol.* 96, 500–508

Kumar, N. Suresh, and G. Venkateswerlu. "Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*." *FEMS microbiology letters* 159.1 (1998): 113-120.

Kunitz, Mf. "Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties." *The Journal of general physiology* 30.4 (1947): 291-310.

Lichtfouse, Eric, "Agronomy for sustainable agriculture: a review." *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, 2009. 1-7.

Liu, Hong, and Herbert HP Fang. "Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges." *Journal of biotechnology* 95.3 (2002): 249-256.

Moss, Norma, and Brian Dymond. "Flocculation: Theory and application." *Mine and Quarry Journal* 7 (1978): 57-61.

Nakajima, Akira, and Takashi Sakaguchi. "Uptake and removal of iron by immobilised persimmon tannin." *Journal of chemical technology and biotechnology* 75.11 (2000): 977-982.

Nakano, Yoshio, Kenji Takeshita, and Toshiro Tsutsumi. "Adsorption mechanism of hexavalent chromium by redox within condensed-tannin gel." *Water Research* 35.2 (2001): 496-500.

Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2017). Pilot-scale biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using starch industry wastewater as raw material. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(9), 623-630.

Nouha, Klai, Ram Saurabh Kumar, and R. D. Tyagi. "Heavy metals removal from wastewater using extracellular polymeric substances produced by *Cloacibacterium normanense* in wastewater sludge supplemented with crude glycerol and study of extracellular polymeric substances extraction by different methods." *Bioresource technology* 212 (2016): 120-129.

Nir, Shlomo. "Van der Waals interactions between surfaces of biological interest." *Progress in surface science* 8.1 (1977): 1-58.

ÖZACAR M and SENGIL IA (2000) Effectiveness of tannins obtained from valonia as a coagulant aid for dewatering of sludge. *Water Res.* 34 (4) 1407-1412.

ÖZACAR M and SENGIL IA (2003) Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles. *Colloid Surface A* 229 (1-3) 83-96.

Pan, Cindy, Homa Rezaei, and Amandeep Soor. "Chitosan disrupts membrane permeability of lactic acid bacteria." *J. Exp. Microbiol. Immunol* 15 (2011): 7-14.

Pretty, Jules N. "Participatory learning for sustainable agriculture." *World development* 23.8 (1995): 1247-1263.

Rey, Delphine, Marie-Paule Pautou, and Jean-Claude Meyran. "Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae." *Journal of invertebrate pathology* 73.2 (1999): 173-181.

ROUSSY J, VAN VOOREN M and GUIBAL E (2004) Chitosan for the coagulation and flocculation of mineral colloids. *J. Disp. Sci. Technol.* 25 (5) 663-677.

Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

STRAND SP, NORDENGEN N and ØSTGAARD K (2002) Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria. *Water Res.* 36 (19) 4745-4752.

STRAND SP, VÅRUM KM and ØSTGAARD K (2003) Interactions between chitosan and bacterial suspension - adsorption and flocculation. *Colloid Surface B* 27 (1) 71-81

Thakore, Yatin. "The biopesticide market for global agricultural use." *Industrial Biotechnology* 2.3 (2006): 194-208.

Tzeng, Yew-Min, Hung-Yieng Tsun, and Yaw-Nan Chang. "Recovery of thuringiensin with cetylpyridinium chloride using micellar-enhanced ultrafiltration process." *Biotechnology progress* 15.3 (1999): 580-586.

Valero JR (1990) Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec. L'Aubelle 12-15

Vedoy, Diógenes RL, and Joao BP Soares. "Water-soluble polymers for oil sands tailing treatment: A Review." *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 93.5 (2015): 888-904

Verwey, Evert Johannes Willem, and J. Th G. Overbeek. "Theory of the stability of lyophobic colloids." *Journal of Colloid Science* 10.2 (1955): 224-225.

Vu, K. D., Yan, S., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2009). Induced production of chitinase to enhance entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* employing starch industry wastewater as a substrate. *Bioresource technology*, 100(21), 5260-5269.

Winship, K. A. "Toxicity of aluminium: a historical review. II." *Adverse drug reactions and toxicological reviews* 12.3 (1993): 177-211.

Wong, H. H., B. K. O'Neill, and A. P. Middelberg. "Centrifugal recovery and dissolution of recombinant Gly-IGF-II inclusion-bodies: the impact of feedrate and re-centrifugation on protein yield." *Bioseparation* 6.3 (1996): 185-192.

Yamaguchi, H., Higasida, R., Higuchi, M., & Sakata, I. (1992). Adsorption mechanism of heavy-metal ion by microspherical tannin resin. *Journal of Applied Polymer Science*, 45(8), 1463-1472.

Yeza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y., & Smith, J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 545-552.

Zemaitaitiene RJ, Zlobaite E, Klimaviciute R and Zemaitaitis A (2003). The role of anionic substances in removal of textile dyes from solutions using cationic flocculant. *Colloid Surface A* 214 (1-3) 37-47

Zhou, Y., Xing, X. H., Liu, Z., Cui, L., Yu, A., Feng, Q., & Yang, H. (2008). Enhanced coagulation of ferric chloride aided by tannic acid for phosphorus removal from wastewater. *Chemosphere*, 72(2), 290-298.

Zouari, Nabil, and Samir Jaoua. "Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media." *Enzyme and Microbial technology* 25.3 (1999): 364-371.

Table 1: SIW characteristics - Suggested wavelength and estimated detection limit for minerals selected by ICP-AES axial Vista

Minerals	Suggested wavelength (nm)	Estimated detection limit (mg/L)	Concentrations (mg/L)
AL	396.152	0.0013	13
As	193.696	0.0021	21
B	249.678	0.0006	7
Ba	455.403	0.0005	6
Ca	317.933	0.0022	2.890
Cd	214.439	0.0001	<1
Co	238.892	0.0003	<3
Cr	267.716	0.00018	5
Cu	324.754	0.0011	11
Fe	238.204	0.00017	100
K	766.491	0.0016	19.500
Mg	279.553	0.00018	5.700
Mn	257.610	0.00004	56.1
Mo	202.032	0.0007	8
Na	588.995	0.0019	33.100
Ni	231.604	0.0007	7
P	177.434	0.003	15.800
Pb	220.353	0.0015	15
S	181.972	0.007	6.100
Sb	217.582	0.003	30
Sc	335.372	0.00008	5.7
Se	196.026	0.005	50
Sn	189.925	0.0018	18
Sr	407.771	0.00017	3
Ti	337.280	0.00011	4
V	292.401	0.0004	4
Zn	206.200	0.0004	37
Physical and chemical characteristics			
Total organic carbon (mg/L)	4990		
Total organic nitrogen (mg/L)	460		
Ammonia nitrogen (mg-N/L)	20.1		
pH	3.5		
Suspended solids (g/L)	4.05		

Table 2 : Standard Semi-Synthetic Soybean Medium Composition and 25% Soybean fortified in SIW Medium.

Standard soybean medium constituents	Concentration (100%) g/L	Concentration (25%) g/L
CaCO₃	2	-
FeSO₄	0,04	-
Glucose	10	2,5
K₂HPO₄	2	-
KH₂PO₄	2	-
MgSO₄	0,6	-
Soybean flour	30	7,5
Starch	10	2,5

Table 3: Formulation composition for a 100 L volume

Additives	Amount
Centrifuged slurry (L)	60
Propionic acid (L)	0.07
Sorbic acid (Kg)	0.01
Carboxymethylcellulose (Kg)	0.15
Sorbitol (Kg)	1
Sodium lauryl sulfate (Kg)	0.05
Xanthan Gum (Kg)	0.2
Molasses (Kg)	0.3
Potassium silicate (Kg)	0.25
Sodium acetate (Kg)	1.7
Acetic acid (L)	0.25
Fermented broth (L)	35

Table 4: Floc size, particle size, proteases activity and turbidity after addition of chitosan to fermented broth at different pH (SIW fermented broth)



	pH 7						
Chitosan Concentration mg/L 	50	100	150	200	400	700	Control
Floc size	Small	Small	Small	Small	medium	medium	small
Particle size (μm)	110 ± 8.8	110 ± 8.8	110 ± 8.8	108 ± 8.64	145 ± 11.6	145 ± 11.6	119 ± 9.52
Protease (UI/mL)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	pH 5						
Chitosan Concentration mg/L 	50	100	150	200	400	700	Control
Floc size	Small	Medium	Medium	Medium	Large	large	Small
Particle size (μm)	110 ± 8.8	180 ± 14	180 ± 14	170 ± 13	281 ± 22.5	281 ± 22.5	120 ± 9.6
Protease (UI/mL)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.08	0.5 ± 0.045	0.5 ± 0.045	1.1 ± 0.1
Chitosan concentration 150 mg/L	pH 5						
Centrifugation		9000	10000	15000	20000	Control	
Protease UI/mL (centrifuged supernatant)		1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.08	0.8 ± 0.07	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	
Turbidity NTU (centrifuged supernatant)		35 ± 1.05	25 ± 0.75	30 ± 0.9	45 ± 1.35	80 ± 2.4	

Table 5: Physical and biological parameters after addition of chitosan to fermented broth of SIW fortified with soybean medium at pH 5

pH 5	Chitosan concentration						Control
Concentration mg/L	50	100	150	200	400	800	0
Floc size	Small	Small	Small	Medium	large	large	Small
Potential Zeta mV	-30 ± 1.8	-25 ± 1.5	-15 ± 0.9	-15 ± 0.9	-10 ± 0.6	-10 ± 0.6	-30 ± 1.8
Turbidity in supernatant NTU	300 ± 15	300 ± 15	205±10.25	105 ± 5.25	90 ± 4.5	75 ± 3.75	330 ±16.5
Totals cells count in the supernatant CFU/mL	1 x 10 ⁶ ± 0.05	9.10 x 10 ⁵ ± 0.45	8.60 x 10 ⁵ ± 0.43	7.50 x 10 ⁵ ± 0.37	1.50 x 10 ⁵ ± 0.075	6 x 10 ⁴ ± 0.3	1 x 10 ⁶ ± 0.05
Viabiles spores count in the supernatant CFU/mL	8 x 10 ⁵ ± 0.4	8 x 10 ⁵ ± 0.4	7.50 x 10 ⁵ ± 0.37	7 x 10 ⁵ ± 0.35	2 x 10 ⁵ ± 0.1	5.5 x 10 ⁴ ± 0.27	8.5 x 10 ⁵ ± 0.42
Endotoxin (in settled phase) µg/mL	1150 ± 103	1150 ± 103	1170 ± 105	1170 ±105	1170 ± 105	1160 ± 104	1150 ± 103
Particle size µm	80 ± 4	80 ± 4	90 ± 4.5	140 ± 7	160 ± 8	180 ± 9	85 ± 4.3
pH 5	Chitosan concentration 800 mg/L						
Batch cenrifugation rpm	9000	10000	15000	20000	Control		

Turbidity of supernatant NTU	60 ± 3	60 ± 3	40 ± 2	55 ± 2.8	100 ± 5
Totals cells count CFU\mL	5.5 x 10 ³ ± 0.3	4.8 x 10 ³ ± 0.28	1.10 x 10 ³ ± 0.07	1.30 x 10 ³ ± 0.08	5.50 x 10 ⁵ ± 0.3
Viabes spores count CFU\mL	4.50 x 10 ³ ± 0.27	3.70 x 10 ³ ± 0.2	7.50 x 10 ² ± 0.45	5.50 x 10 ² ± 0.3	4.50 x 10 ⁵ ± 0.27
Endotoxin concentration (pellet) µg\mL	7850 ± 706	7950 ± 715	7950 ± 715	7630 ± 686	7442 ± 670
Particle size (Fermented broth, µm	90 ± 4.5	95 ± 4.75	95 ± 4.75	90 ± 4.5	90 ± 4.5

Table 6: Floc size, particle size, protease activity and turbidity (In supernatant) after flocculation with chitosan and tannic acid at pH 5 and 7 (SIW fermented broth without fortification)

	Chitosan 400 mg/L				
	pH 7				
Tannic acid concentration mg/L	150	300	600	900	control
Floc size	Small	Small	Medium	Medium	Small
Particle size μm	110 ± 8.8	110 ± 8.8	140 ± 11	180 ± 14	115 ± 9.2
protease UI/mL	1.3 ± 0.12	1.3 ± 0.12	1.3 ± 0.12	1.3 ± 0.12	1.3 ± 0.12
	Chitosan 150 mg/L				
	pH 5				
Tannic acid concentration mg/L	150	300	500	900	control
Floc size	Small	Medium	Large	Medium	Small
Particle size μm	115 ± 9	150 ± 12	295 ± 23	140 ± 11	120 ± 9
Protease UI/mL	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.12
	Chitosane 150 mg/L and tannic acid 500 mg/L				
	pH 5				
Centrifugation Rpm	10000	15000	20000	Control	
Protease (UI/mL)	0.9 ± 0.08	0.9 ± 0.08	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	
Turbidity (NTU)	25 ± 0.75	25 ± 0.75	45 ± 1.35	80 ± 2.4	

Table 7 : Physical and biological parameter analysis after addition of chitosan and tannic acid at pH 5

pH 7	Chitosan concentration 800 mg/L				
Tannic acid concentration mg/L	150	300	600	900	Control
Floc size	Small	Small	Medium	Medium	Small
Potential zeta (mV)	-30 ± 1.8	-30 ± 1.8	-20 ± 1.2	-15 ± 0.9	-40 ± 2.4
Turbidity (supernatant after settling) (NTU)	250 ± 12.5	250 ± 12.5	150 ± 7.5	105 ± 5.25	300 ± 15
Totals cells count in supernatant (CFU/mL)	1 x 10 ⁶ ± 0.06	7.5 x 10 ⁵ ± 0.45	6.5 x 10 ⁵ ± 0.39	1.5 x 10 ⁵ ± 0.09	1 x 10 ⁶ ± 0.06
Viable spores count in supernatant (CFU/mL)	8.5 x 10 ⁵ ± 0.5	5.5 x 10 ⁵ ± 0.3	5 x 10 ⁵ ± 0.3	1.05 x 10 ⁵ ± 0.06	8.5 x 10 ⁵ ± 0.5
Endotoxin (settled phase) µg/mL	1100 ± 99	1125 ± 101	1130 ± 101	1160 ± 104	1100 ± 99
Particle size (µm)	160 ± 8	180 ± 9	240 ± 12	280 ± 14	135 ± 6.8
pH 5	Chitosan concentration 800 mg/L				
Tannic acid concentration mg/L	150	300	500	900	Control
Floc size	Small	Medium	Large	Medium	Small
Potential zeta	-20 ± 1.2	-10 ± 0.6	-20 ± 1.2	-30 ± 1.8	-30 ± 1.8

(mV)					
Turbidity of supernatant (NTU)	100 ± 5	50 ± 2.5	50 ± 2.5	85 ± 4.3	210 ± 10.5
Totals cells count supernatant (CFU/mL)	3.5 x 10 ⁴ ± 0.21	1.5 x 10 ³ ± 0.09	1.2 x 10 ³ ± 0.07	4.5 x 10 ³ ± 0.27	1 x 10 ⁶ ± 0.06
Viabes spores count suprnatant (CFU/mL)	2.5 x 10 ⁴ ± 0.15	5.1 x 10 ² ± 0.3	3.1 x 10 ² ± 0.18	1 x 10 ³ ± 0.06	8.5 x 10 ⁵ ± 0.5
Endotoxin (Settled phase) (µg/mL)	1210 ± 108	1310 ± 117	1290 ± 116	1240 ± 111	1140 ± 103
Particles size (µm)	115 ± 5.8	150 ± 7.5	295 ± 15	140 ± 7	120 ± 6
pH 5	Chitosan concentration 800mg/L- Tannic acid concentration 300mg/L				
Batch centrifugal force rpm	10000	15000	20000	Control	
Turbidity in supernatant (NTU)	35 ± 1.75	35 ± 1.75	55 ± 2.75	90 ± 4.5	
Totals cells count in supernatant (CFU/mL)	2.1 x 10 ² ± 0.13	1.8 x 10 ² ± 0.11	2.1 x 10 ³ ± 0.13	3.3 x 10 ⁵ ± 0.2	
Viabes spores count in supernatant (CFU/mL)	1.3 x 10 ² ± 0.08	1.2 x 10 ² ± 0.07	5 x 10 ² ± 0.3	2.1 x 10 ⁵ ± 0.13	

Endotoxin in pellet ($\mu\text{g/mL}$)	8000 ± 720	8700 ± 783	7960 ± 716	7442 ± 670

Table 8 : Biological parameter of the formulation prepared from centrifuged slurry of control and fermented broth of SIW fortified with Soybean medium. The fermented broths were fortified with chitosan and tannic acid before continuous centrifugation in pilot plant.

SIW fortified with soybean medium (control) formulations	Totals cells (CFU/mL)	Viabes spores (CFU/mL)	Endotoxin ($\mu\text{g/mL}$)	Viscosity (mPas)	Potential zeta (mV)
Formulation (chitosan- Tannic acid)	$9 \times 10^9 \pm 0.54$	$8.3 \times 10^9 \pm 0.5$	8250 ± 742	185 ± 9.25	-23 ± 1.37
Formulation control (no CH or TA)	$8.3 \times 10^9 \pm 0.5$	$7.8 \times 10^9 \pm 0.46$	7442 ± 669	137 ± 6.85	-27 ± 1.62
Supernatant (chitosan- Tannic acid)	$1.2 \times 10^5 \pm 0.07$	$4.5 \times 10^4 \pm 0.27$	25 ± 2.25	20 ± 1	-30 ± 1.8
Supernatant control	$1.92 \times 10^6 \pm 0.11$	$1.5 \times 10^6 \pm 0.09$	382 ± 34	20 ± 1	-30 ± 1.8

Table 9 : Biological and physical parameters of the formulation for SIW control and SIW formulation after flocculation with chitosan and tannic acid associated with continuous centrifugation

SIW formulations	Totals cells (CFU/mL)	Viabiles spores (CFU/mL)	Endotoxin ($\mu\text{g/mL}$)	Viscosity (mPas)	Potential zeta (mV)
Formulation (chitosan-Tannic acid)	$4.5 \times 10^9 \pm 0.27$	$3.9 \times 10^9 \pm 0.23$	3500 ± 315	190 ± 9.5	-25 ± 1.5
Formulation control	$3.19 \times 10^9 \pm 0.19$	$2.95 \times 10^9 \pm 0.18$	2951 \pm 265	185 \pm 9.25	-30 \pm 1.8
Supernatant (chitosan-Tannic acid)	$6.2 \times 10^5 \pm 0.37$	$5.5 \times 10^5 \pm 0.33$	96 ± 8.6	22 ± 1.1	-30 ± 1.8
Supernatant control	$3.06 \times 10^7 \pm 0.18$	$2.7 \times 10^6 \pm 0.16$	195 ± 17.6	20 ± 1	-29 ± 1.74

Table 10: Entomotoxicity of different formulations prepared from different fermented broth and with addition of flocculants and further centrifuged (batch centrifuge) compared to control.

Entomotoxicity of the formulations prepared from:	control	CH-TA	Chitosan
SIW fermented broth (IU/ μ L)	17 000 \pm 1359	22 450 \pm 1796	21 000 \pm 1680
Fermented broth of SIW fortified with soybean medium (UI/ μ L)	38 000 \pm 3040	43 000 \pm 3440	39 500 \pm 3160

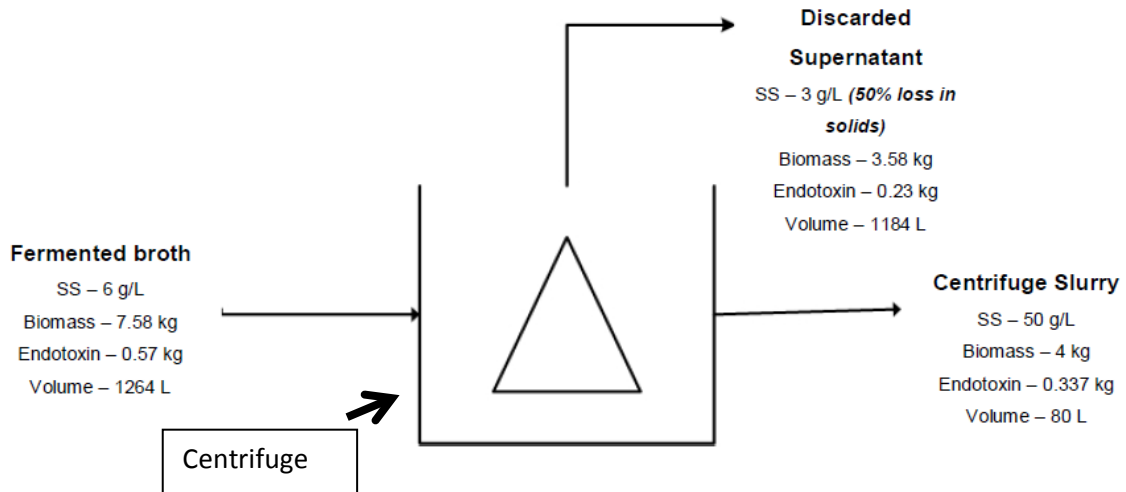


Figure 1: Mass balance of biopesticide production process around centrifuge using SIW (control) as growth medium: biomass and endotoxin losses in supernatant.

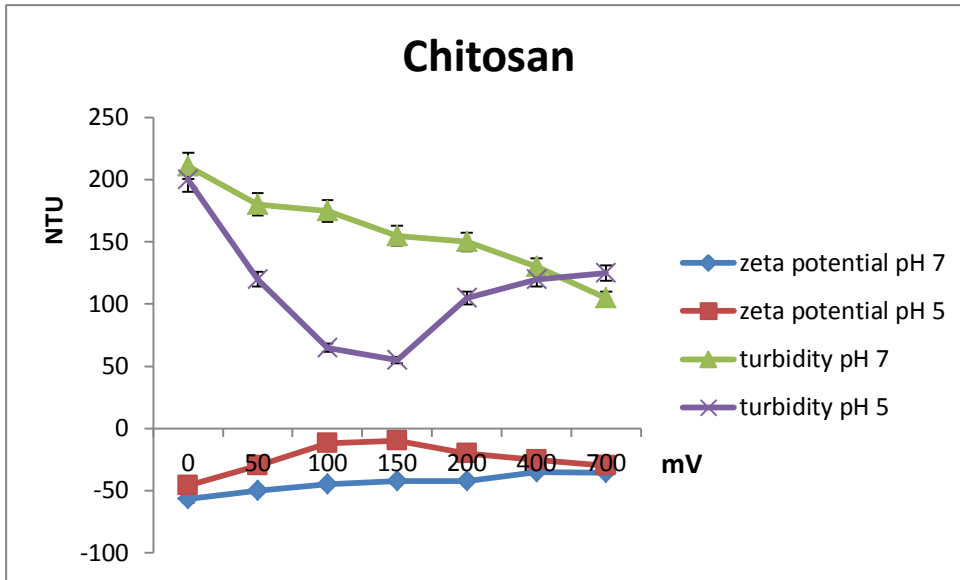


Figure 2: Variation of turbidity (NTU) and zeta potential (mV) in SIW fermented broth supernatant employing different dose of chitosan for flocculation at pH 5 and 7

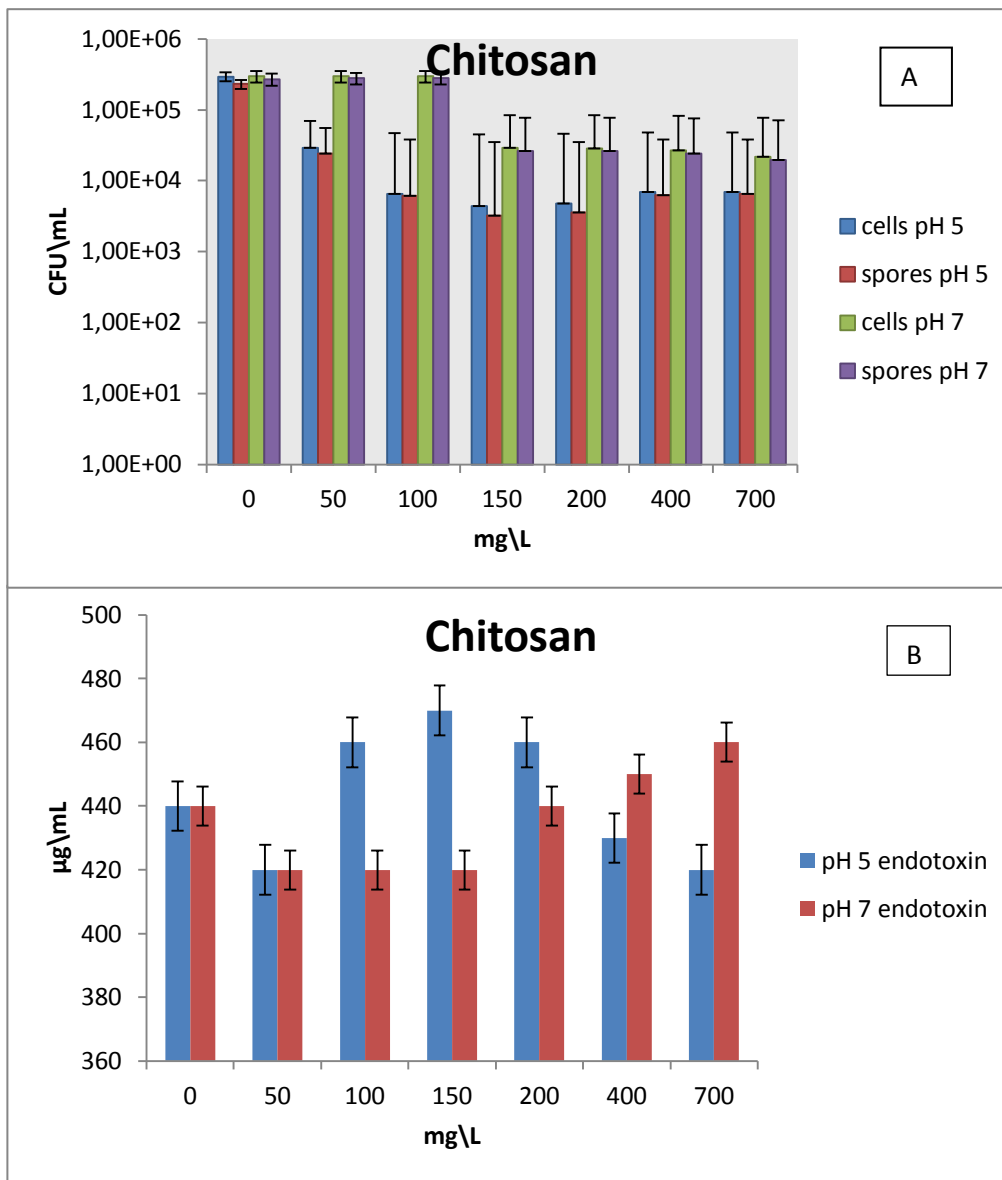


Figure 3: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant, (B) endotoxins concentration in pellet, determination at pH 5 and 7 after chitosan flocculation (SIW fermented broth).

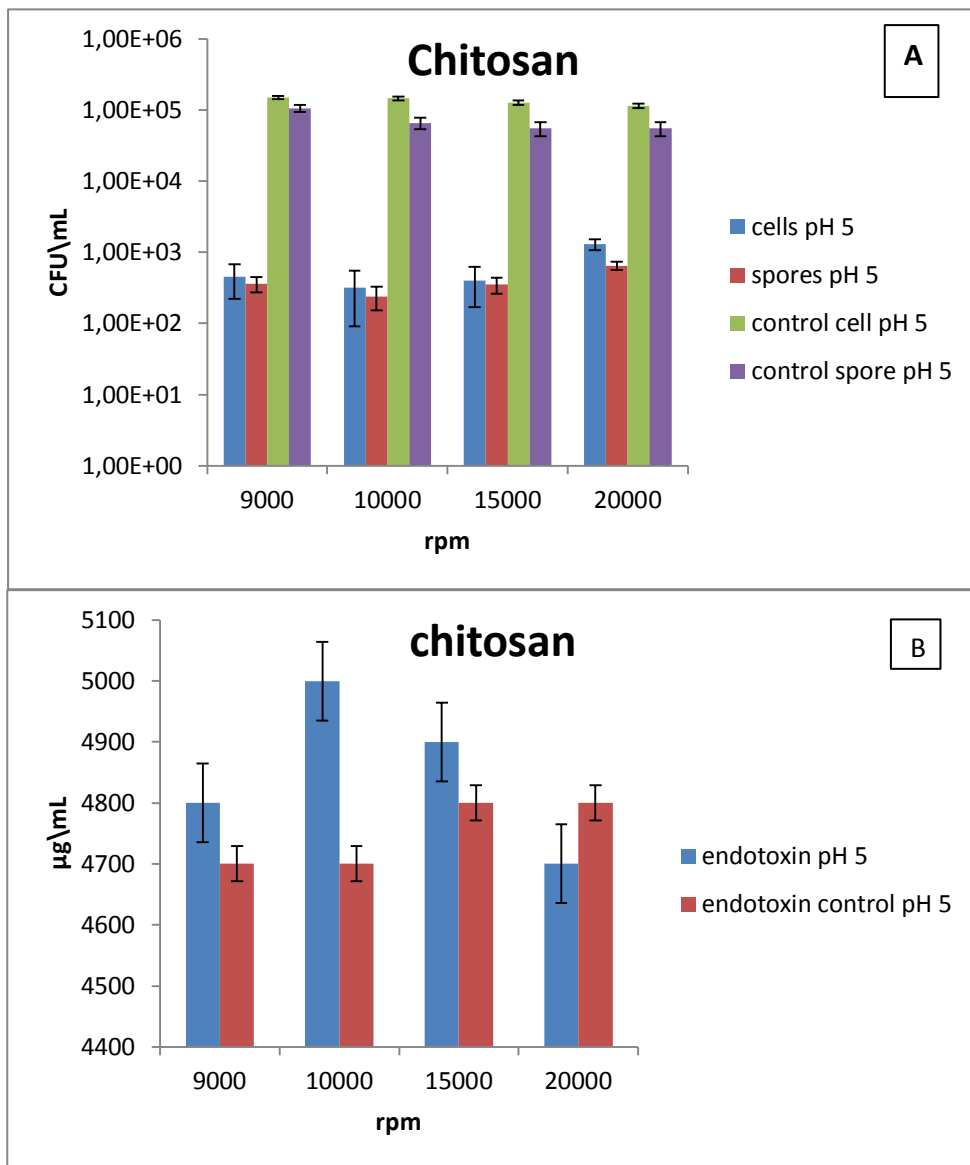


Figure 4: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after chitosan flocculation and centrifugation at pH 5 (SIW fermented broth).

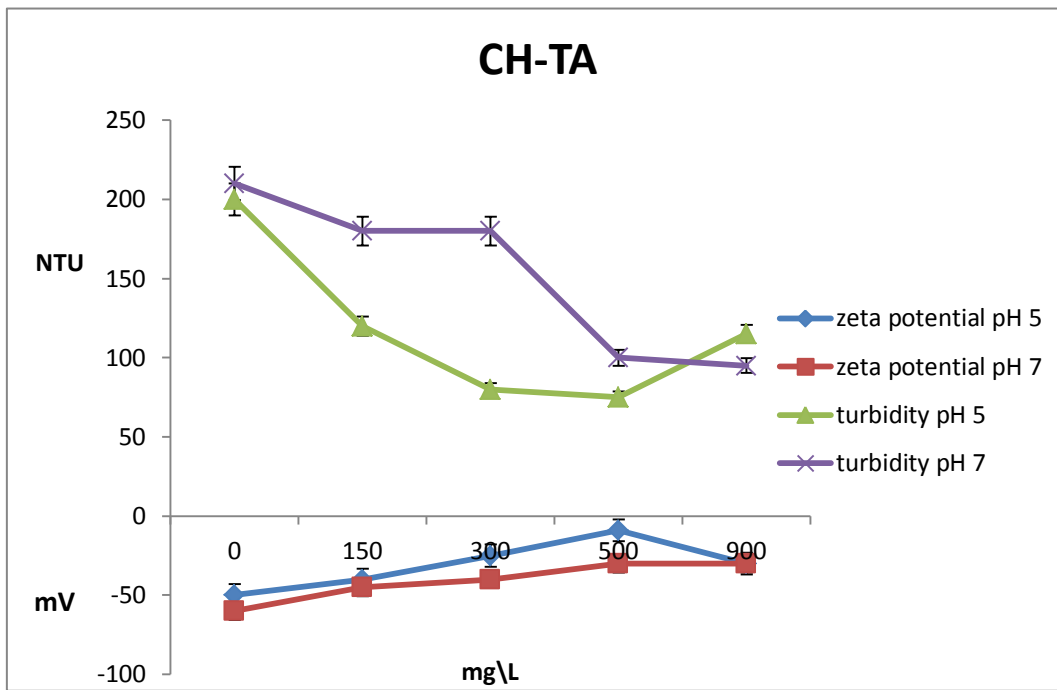


Figure 5: Variation of turbidity in supernatant and zeta potential after chitosan (CH) and tannic acid (TA) flocculation at pH 5 and pH 7

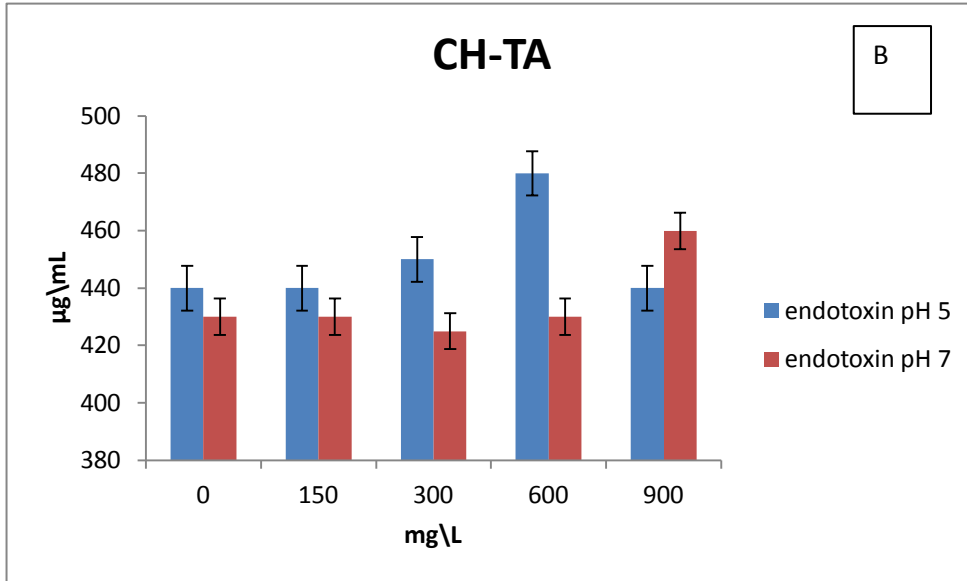


Figure 6: (A) Total cells count, viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after flocculation with chitosan and tannic acid at pH 5 and 7 (SIW fermentation broth)

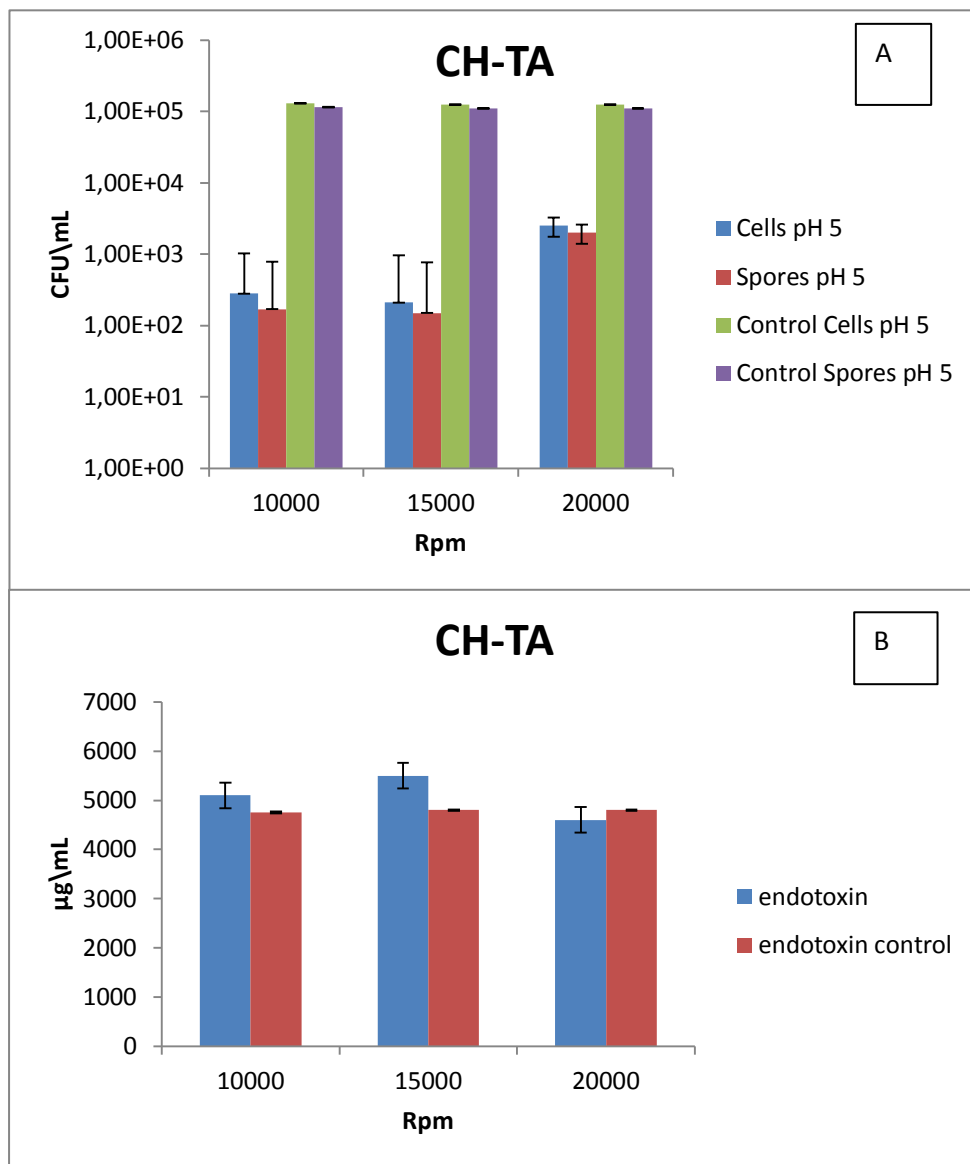


Figure 7: (A) Total cells count and viable spores count in supernatant. (B) Endotoxins concentration in pellet after flocculation (chitosan-tannic acid) at pH 5 followed by centrifugation (SIW fermentation broth).

Biopesticide optimization and formulation processes based on starch industrial wastewater fortified with soybean medium

A. Ndao, R.D. Tyagi, J.R. Valéro

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis var kurstaki (Btk) fermentation using starch industry wastewater (SIW) fortified with 25% soybean (w/v) medium and the biopesticide formulations prepared from the fermentation broths of these raw materials were evaluated. Starch wastewater supplemented with soybean medium showed an increase in Btk cell count (1.65×10^9 CFU/mL; SIW: 1.95×10^8 CFU/mL), spore synthesis (1.35×10^9 CFU/mL; SIW: 1.5×10^8 CFU/mL) and delta endotoxin concentration (1170 $\mu\text{g/mL}$; SIW: 436 $\mu\text{g/m}$) compared to non-fortified SIW. SIW fortified with soybean medium was rich in glucose (1500mg/L; SIW: 940mg/L), sucrose (2300mg/L; SIW: 20mg/L) and fructose (780mg/L; SIW: 290 mg/L). Entomotoxicity of the formulation produced using fermented broth of SIW fortified with soybean (38000 IU/ μL) showed a significant increase compared to non-fortified SIW (21000 IU/ μL), Foray 76B (20000 IU/ μL) and Btk sander's (12500 IU/ μL) (Commercial biopesticide). The enhanced entomotoxicity led to the development of a diluted formulation (F2d) based on SIW fortified with soybean medium. The F2d formulation provides entomotoxicity of 30 BIU/ha (Billion international unit) (21500 IU/ μL), which is equivalent to Foray 76B commercial biopesticide. Moreover, this strategy generates 22L of biopesticide formulation from 100 L of fermented broth compared to 11 L of formulation per 100 L of fermented broth from undiluted SIW fortified with soybean. Optimization of adjuvants to resist U. V. radiation, rainfastness, viscosity and particle dispersion was also carried out on the SIW fortified with soybean formulation and F2d formulation.

Introduction

The spruce budworm is a devastating and endemic insect pest of North American forests. Its life cycle is one generation per year. After maturation in late fall followed by winter incubation, the 3rd-stage caterpillar moves into the foliage of balsam fir or spruce in early spring. This population of caterpillars causes an epidemic every 30 years. Given the importance of the forestry in local economy and the resurgence of the caterpillar population year after year, the fight against this scourge remains crucial (Blais 1983, Dymond et al. 2010).

Thus, biological control has been undertaken for several years in Canadian forests. Biopesticides based on *Bacillus thuringiensis var Kurstaki* are the most commonly used to control the problem (Carrow 1983, Van Frankenhuyzen et al. 2016). Btk produces protein crystals made up of delta endotoxin, which bind to the receptors of the larvae's epithelial cells. The cells are thus destabilized by the creation of transmembrane pores through which they cross the cells. The integrity of the epithelial cells is thus affected, leading to paralysis of the larvae's digestive system and the cessation of feeding. At the same time, viable spores produced during the stationary phase of bacterial growth will germinate in the mid gut of the budworm and produce other Btk cells and protein crystals. Proliferation of the bacterium will cause septicemia in larvae and death (Dang et al. 2009; Ndao et al. 2017; De Maagd et al. 2001; Bravo et al. 2007).

The advantages of using Btk are numerous: 1) it is highly specific to lepidopteran larvae, certain dipterans and beetles, 2) low persistence after application, 3) and harmless to human and animal health (Ndao et al. 2017; Brar et al. 2005). However, the purchase price of substrates for Btk cultivation is a barrier to the competitiveness of Btk-based biopesticides. The raw material cost for the production of *Bacillus Thuringiensis*-based biopesticide represents up to 40% of the total production cost (Linsanky et al., 1993). It is therefore essential to find alternative substrates for the production of Btk-based biopesticides at competitive costs. Several authors have indicated that agri-food residues or sludge from sewage treatment plants could be viable alternatives to semi-synthetic substrates (; Sarrafzadeh and Mohammad Hossein 2012; Devidas Patil et al. 2014; Tyagi et al. 2002).

In our research group, studies on Btk-based biopesticide production by valorizing starch industrial wastewater were successfully carried out. A process consisting of the following

steps was developed: 1) Btk fermentation using starch producing industry wastewater, 2) centrifugation of the fermented broth obtained and 3) the formulation composed of an optimized ratio of suspension of centrifuged slurry, fermented broth volume and adjuvants (protective and stabilizing agents). However, the low productivity in terms of formulation volume obtained per unit volume of the fermented broth has led to the research on fortification of the starch industry wastewater with other potential substrate. This fortification would allow a better concentration of total cells, viable spores and delta endotoxin in the fermented broth. Fortification of starch industry wastewater with other rich substrate can reduce the number of centrifugation compared to the non-fortified medium and consequently increase the formulation productivity.

Thus, the aim of this study was to produce biopesticide formulation based on starch producing industry wastewater fortified with soybean medium, and optimization of the formulated product using different adjuvants and their concentration.

Materials and methods

Btk strain

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* HD1 (Btk) strain was obtained from Cederlane Laboratories INC (4410 Paletta Court, Bullington, ON, Canada, L7L 5R2). The Btk strain was cultivated and sub-cultured on tryptic soy agar (TSA) at 30°C for 12 h. The pure bacterial subculture was stored at 4°C until used for inoculum preparation. The SIW was collected from ADM-Ogilvie (Candiac, Quebec, Canada) and was used as culture medium for Btk inoculum preparation.

Growth media

Inoculum

The culture medium (SIW) used for Btk fermentation was obtained from ADM-Ogilvie (155 Avenue d' Iberia, Candiac, QC J5R 3H1), a cornstarch processing industry. The composition of this medium, analyzed by ICP-AES axial Vista, is presented in table 1. The starch residues provide a dissolved organic carbon content of 4990 mg/L and a dissolved

nitrogen content of 460mg/L. SIW (pH 3.5) was stored in the cold room at 4°C until it was used. Its shelf life was considered to be under two months.

The Btk strain was grown in SIW alone and SIW fortified with soybean (25% w/v, which means 1/4th components of the soybean medium were added to starch industry wastewater) (Table 2). SIW fortified with soybean medium does not contain minerals present in the standard soybean medium. These minerals are found in high concentration in SIW. In addition, glucose was sterilized separately from SIW and the minerals. Glucose was mixed aseptically with the rest of the medium after sterilization. In fact, it is described that a Maillard complex is formed when glucose is sterilized in presence of organic matter (SIW) (Zhang et al. 2014). This complex reduces availability of glucose for microbial growth. The nitrogen concentration of the fortified soybean medium was 14g/L. Carbohydrate concentration in SIW and SIW fortified with soybean medium in the beginning (0 h) and at the end of fermentation (48 hour) is described in table 3.

Fermentation process

SIW fermentation (2000 L fermenter)

Btk strain stored at -80°C was spread on agar plates (TSA) and placed in an incubator at 30°C for 24 hours. A pure colony of BTK was inoculated in 150 mL erlenmeyer flask containing 40 mL of SIW media (pre-sterilized at 121°C for 15 minutes) at pH 7, stirred at 200 rpm, at 30°C for 9 hours. At the end of the first culture stage, the inoculum (40 mL fermented broth) was transferred to a 4 L erlenmeyer flask containing 2 L SIW medium and incubated under the same operating conditions. After 9 hours of pre-culture, this served as an inoculum for 150 L bioreactor with 100 L SIW content (working volume). The 26 L of the fermented broth (after 9 h) was used to inoculate the 2000 L bioreactor containing 1300 L of sterilized SIW. Thus, each volume of the pre-culture corresponded to 2% (v/v) of the subsequent culture stage. Before inoculation, 150 L and 2000 L bioreactors were sterilized with water before filling it with 100 L and 1300 L of SIW medium followed by sterilization at 121°C for 20 minutes. After sterilization and the cooling to 30°C, acid (H₂SO₄), base (NaOH) and antifoam containers were connected to the fermenter. After that, 2 L and 26 L inoculum were ready for transfer into fermenters under sterile conditions. Fermentation was conducted for 48 hours at pH 7 and at

30°C temperature. Dissolved oxygen (DO) was maintained during the exponential growth phase (0-12h) above 30% by controlling agitation and/or aeration. During the sporulation phase i.e. from 18h to 36h, dissolved oxygen was maintained at 50% or higher. At the end of fermentation, pH was adjusted to 4.5 to avoid crystal protein solubilization by active proteases (produced during fermentation) at basic pH (Yezza et al. 2006). During fermentation, samples were collected after every 3 hours during the first 12 hours of fermentation and every 6 hours until 48 hours. All samples were analyzed for total cells count, viable spores count, and endotoxin concentration.

Fermentation for SIW fortified with soybean medium (150 L fermenter)

Inoculum preparation: Starch industry wastewater was supplemented with soybean medium at 25% (w/v) for inoculum preparation. The inoculum volume corresponded to 2% (v/v) of the bioreactor working volume. 150 L bioreactor had a working volume of 100 L. Thus, the inoculum consists of two steps: 1) a 150 mL erlenmeyer flask containing sterilized 40 mL of SIW and inoculated with a single strain of Btk. Fermentation took place at pH 7, at 30°C temperature, stirring 200 rpm for 9 hours. 2) At the end of this culture, the fermented broth obtained was transferred to a 4 L Erlenmeyer flask containing 2 L of SIW medium. Fermentation under the same operating conditions was carried out for 9 hours. This served as inoculum for 150L fermenter.

Fermentation: 150 L bioreactor (100L working volume) containing SIW fortified with 25% soybean medium was sterilized and inoculated with inoculum (prepared above). The fermentation was conducted for 48h as described above. At the end of fermentation, the pH of the fermented broth was adjusted to 4.5 to avoid the solubilization of crystal proteins by active proteases. Samples were collected after every 3 hours during the first 12 hours of fermentation and every 6 hours until 48 hours. All samples were analyzed for total cells, viable spores count, and endotoxin concentration. Entomotoxicity was determined for the final sample at the end of the fermentation.

Total cell and viable spore count

Total cells count and spores count were determined by counting bacterial colony forming units (CFU) on TSA (Tryptic Soy Agar) plates. All the CFU counts were obtained from an average value of measurements conducted in triplicates. For total spore count, serially diluted samples were placed in a water bath (Buchler Instruments) at 80°C for 10 min and immediately immersed in ice for 10 min. Then, 0.1 mL of diluted sample was plated on TSA medium and incubated at 30°C for 24 h (Imperial II Incubator oven). The presented values are the mean of three separate measurements \pm standard deviation (SD).

Endotoxin concentration

Btk produces cry toxins encoded by different cry genes found on Btk plasmids. Cry toxins consists of parasporal inclusions, which contains crystal proteins or endotoxins. They have a large spectrum of action against larvae of Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera (Schnepf et al. 1998). Endotoxin concentration was determined based on the solubilization of cry proteins under alkaline conditions (Zouari and Jaoua 1999). One mL of each sample was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The pellet containing the mixture of spores, crystal proteins, and cell debris was used to estimate the soluble insecticidal proteins (delta-endotoxin) in alkaline medium. The pellets were washed thrice with 1 mL of 0.14 M NaCl and 0.01 % Triton X-100 solutions. This washing step aids in the removal of soluble proteins and proteases, which might be sticking to the centrifuged pellets affecting the integrity of the crystal proteins (Vu et al. 2009). The pellets of crystal proteins were dissolved in 0.05 N NaOH (pH 12.5) for 3 hours at 30°C. After crystal solubilization, the suspension was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C, and the pellet containing the spores and cell debris was discarded. The supernatant containing the insecticidal crystal proteins was used to determine the concentration of delta-endotoxin by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as a protein standard (MM Bradford 1976). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Batch and continuous centrifugation

Centrifugation is described as the most efficient and least expensive to recover and concentrate the active ingredients of Btk (Brar et al. 2006). It consists of two phases: 1) a pellet or cream depending on their water content and 2) a supernatant. When centrifugation for Btk fermented broth was carried out in batch mode, the concentrate obtained was pellet (low water content). While the continuous centrifugation of Btk fermented broth produced a cream (high water content), which contained the active ingredients of Btk. The concentration of these active ingredients in the cream/pellet is essential since the treatment in the forest consists of 1.5 L biopesticide/ha (Bauce Eric et al. 2004). It is therefore essential that the formulation contains viable spores and protein crystals in high concentration. In this study, continuous centrifugation was performed to concentrate the fermented broth (150 L and 2000 L bioreactors).

SIW supplemented with soybean (150L: 100L working volume) and SIW (2000L: 1300L working volume) fermented broths have undergone continuous centrifugation (GEA GEA Westfalia separator, model: CSC 1506477 15000g x 11800rpm). Centrifugation of SIW fermented broth resulted in 60 L cream (from 1264 L of centrifuged broth) while centrifugation of SIW fortified with soybean fermented broth resulted in 7 L cream (from 96 L of centrifuged broth). The parameters optimized for centrifugation of SIW fortified with soybean fermented broth were:

Discharge time: 2.2min

Feed speed: 5 L/min

Centrifugation speed: 15000g

Back pressure: 8.5 psi

Whereas for SIW fermented broth centrifugation, the optimized parameters were:

Discharge time: 2.5mn

Feed speed: 10 L/min

Centrifugation speed: 15000g

Back pressure: 8.5psi

Prior to centrifugation, 4 L and 36 L volume of fermented broth were removed from 100 and 1300 L of fermented broth respectively for preparations of formulation, which consisted of fermented broth, cream and various additives (Table 4). The final volume of formulation for the SIW fortified with soybean medium was 96 L (from 1264 L of broth centrifuged) while the final volume for SIW was 11 L (from 96 L of broth centrifuged).

A diluted formulation from the SIW fortified with soybean (F2d) formulation was also produced. In this process, a 15 L volume of fermented broth was removed from the SIW fortified with soybean fermented broth (100 L), before centrifugation. The suspension obtained after centrifugation was 6 L (from 85 L of broth centrifuged). This volume was mixed with the 15 L fermented broth and adjuvants (Table 4) for a final volume of 21 L.

Biopesticide formulation

The formulation refers to the downstream stage of the biopesticide production process that aims to achieve stability, integrity and efficacy over time and space (Ndao et al. 2017). The formulation based on ratio of cream and fermented broth ensures optimal entomotoxicity and physical properties of the biopesticide. It is supplemented with different additives. The latter must be environment friendly, inert towards the active ingredients (spores, endotoxins, cells) while ensuring their role. Thus, the formulation was composed of 1) phagostimulant such as molasses, 2) suspending agents: sorbitol, potassium silicate, 3) ultraviolet radiation protection agent: molasses, 4) anti-corrosion agent: potassium silicate, 5) antimicrobial agent: propeonic acid, sorbic acid, 6) adhesive agents: xantham gum, carboxymethylcellulose, molasses, 7) buffer agent. The concentrations of each agent depend on the characteristics of the substrate, i. e. suspended solids, particle size, viscosity. The formulations of SIW, SIW fortified with soybean and F2d are shown in Table 4.

Particle size

Particle size analysis was carried out using a Horiba laser scattering particle size analyzer (LA-950), to produce a particle size distribution. The stirrer and recirculation pump

speed were kept at 250 and 500 rpm to minimize the breakage of flocculated particles. Each sample was analyzed 3 times to confirm the validity and reproducibility of the results. This method was based on the principles of Fraunhofer diffraction and Mie scattering. Results obtained are described below:

D50 indicates that 50% of the particle sizes fall between the measured value.

D90 indicates that 90% of particles are smaller than the obtained value.

D10 indicates that 10% of the particles have a smaller size than the obtained value.

Viscosity

An optimal viscosity will provide uniform distribution of active ingredients on the tree leaves and promote efficient applications. Viscosity was measured using the Brookfield DVII pro, which is a viscometer with Rheocalc 32, SC-34 pin software (small sample adapter) (Gnepe et al. 2014). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

U.V radiation

Ultraviolet radiation tests are determined based on a specific ultraviolet emission source (Transilluminator, UVP®, San Gabriel, CA, USA) with maximum emission spectra of 366nm (UV-A) and 312 nm (UV-B). These radiation spectra are considered lethal to spores and inactive crystal proteins. Several studies have mentioned the lethal nature of UV-B radiation, which affected the genetic material of viable spores. Several authors mentioned the implication of UV radiation in the inactivation of crystal proteins (Guimaraes et al. 2007). Crystal proteins would adsorb on chromophores (presently uncharacterized) from the fermented broth. These chromophores absorb light at 300-380nm, and pass their excited state to oxygen molecules that convert into free and highly reactive radicals. These radicals are said to attack the tryptophan chains present in endotoxins crystals, affecting the integrity of these proteins and causing their

inactivation. Hadapad et al. (2009) proposed the use of reductive agents (Molasses) in Btk formulations to protect crystal proteins from oxygen radicals.

The experiment was carried out as follows: a cubical box covered with mirror (to reflect the U. V. rays on the six surfaces) contained the vials (containing 1 ml of formulations), which were placed on an aluminum-coated spreader from 20 cm of the U. V. lamp. Samples of fermented broth (SIW and SIW fortified with soybean) and formulations (SIW, SIW fortified with soybean, F2d, Foray 76B and Btk sander's) were removed at each 0, 5, 10, 20, 30, 45, 90 and 300h. These samples determined the exposure time to decrease the entomotoxicity by half ($T_{x_{0.5}}$) for the different samples studied (Brar et al. 2005). The presented values are the mean of three separate experiments \pm Standard Deviation (SD).

Rainfastness

The rainfastness test was carried out in the forest application conditions where 1.5 L of formulation was applied per hectare of the forest. The treated area was equivalent to 0.15 mL per square meter (m^2). The floor area of a young balsam fir was about one m^2 (Figure 1). Thus, 0.15 mL of our formulations (SIW, SIW fortified with soybean and F2d) was enough to treat a young balsam fir tree. The control formulation consisted of adjuvants without the active Btk agent (broth or cream). The different formulations were applied to the balsam fir trees and then after 5 days of the application, a watering corresponding to 3cm of rainfall on the ground was applied, which represented 300ml or a heavy rainfall of 30mm.

The evaluation of adhesiveness was done by impregnating the needles of balsam fir trees on a TSA agar at different time periods ($t=0, 1, 24, 48, 72h, 5 \text{ days}, 6 \text{ days}, 7 \text{ days}$) (Figure 2). The number of total residual cells was determined to determine the adhesiveness of the formulation.

Suspending Agent

Btk liquid formulations are often stored before use in warehouses or during aerial application. It is important that particles of formulation remain uniformly distributed in solution

during storage. The application of good biopesticide requires that the formulated product exhibit a proper suspension and dispersion property. Spores number and protein crystals concentration per droplet are important parameter during dispersion. In fact, when the larvae ingest a non-lethal dose droplet, they may stop eating for several days but will survive again and continue to cause damage (Smimoff and Valéro, 1983).

Sorbitol is often used in the food industry and in a variety of biopesticides to impart dispersing and suspending properties to formulations (Smimoff and Juneau 1982; Pazhang et al. 2016). Based on the substrate and suspended solids concentration, sorbitol optimization is studied. The experimental design of this study is carried out by taking 50 mL of the formulation studied and suspending it in 100 mL of distilled water. This mixture is subjected to a 30-minute settling period. At the end of which, the turbidity of the supernatant, total solids and settling materials are measured. The percentage of suspension of: SIW formulation (F.SIW), SIW formulation sorbitol-free (C. SIW), formulation of SIW fortified with soybean (F. SIW+soybean), formulation of SIW fortified with soybean sorbitol-free (C. SIW+soybean), Foray 76B and F2d is determined as follows:

$$\frac{\text{Turbidity (NTU)}}{\text{Total solids } \left(\frac{g}{L}\right) - \text{Settling solids } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

Zeta potential

Zeta potential (ζ) of each sample collected from experiments was analyzed using Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000 (CAD instrumentation France). The zeta potential values were obtained from the average of 3 measurements. The average values are presented with its half-width confidence interval at 95% confidence level.

Entomotixicity

The entomotixicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality of eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) is responsible for the destruction of

conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray76 B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU) (Dulmage 1970). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented SIW samples using spruce budworm larvae.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method. In this technique, 1.5mL of serially diluted sample was mixed into 30 mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL- in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to compare the mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The presented values represent the mean of three determination of three independent experiments ± SD.

Entomotoxicity (UI/ µl) =

$$\frac{\left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-3})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-3})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-4})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-4})}\right) + \left(\frac{\%(\text{mortality sample } 10^{-5})}{\%(\text{mortality standard } 10^{-5})}\right)}{3} \times 19950$$

Results

Btk fermentation using SIW or SIW fortified with soybean medium

Btk cell growth results presented in Figure 3 (A) exhibited exponential growth during 0 h to 12 h of fermentation for both substrates. The lack of lag phase is due to two factors:

- Inoculum age, which has been optimized in previous work (Ndao et al. 2017). For a Btk pre-culture, an inoculum age between 8 and 9h is desirable in order to obtain bacterial cells that are free of viable spores. In fact, at a culture age of 12h or older, viable spores begin to appear as vegetative cells. Viable spores need nutrients to germinate again

before they start new cell divisions. These intermediate steps in cell proliferation and protein crystal synthesis leads to lag phase and reduce biomass to substrate yield.

- The second factor is the pre-culture medium, which must be of the same nature as the bioreactor containing the final fermentation medium (SIW or SIW fortified with soybean medium). This bacterial adaptation leads to arsenal enzyme synthesis in pre-culture such as extracellular proteases, amylases and other enzymes necessary for nutrient degradation, which are also needed in bioreactor growth (Dang et al. 2009; Yezza et al. 2006).

From the first hour of the culture, SIW fortified with soybean 25% (w/v) had a cell count of 1.41×10^7 CFU/mL while the SIW showed a cell count of 1.5×10^6 CFU/mL at 0h. Moreover, at 30h of fermentation, the maximum total cell count was 1.65×10^9 CFU/mL for SIW fortified with soya. While for the SIW medium, the maximum total cell count at 12 hours of fermentation was 2×10^8 CFU/mL.

It should be noted that fermentation does not end at the maximum cellular concentration as the maturation of viable spores and synthesis of crystal proteins occurs up to 48 hours of fermentation. This maturation ends with viable spores and release of crystal proteins from the cell (Ndao et al. 2017).

Furthermore, 1 log difference in total cells count between the two media can be explained by the fortification of SIW medium with soybean. In fact, LC-MS-MS results showed (Table 3), a high carbon concentration (in form of reduction sugar) available for Btk in the fortified medium. Also, these results indicate the bacterial preference for glucose and fructose as after 48 hours of fermentation, their concentration substantially decreased. While Xylose, which is a 5-carbon carbohydrate, cannot be metabolized by Btk (Mazimira et al. 2012). Total nitrogen deficiency in SIW medium (0.45g/L) is amended by SIW fortification with soybean (14g/L).

The sporulation (Figure 3B) follows the same trend in SIW and SIW fortified with soybean, it appears that the presence of increased nitrogen source in the fortified medium did not inhibit sporulation as described by Zouari and Jaoua (1999). From a biochemical point of view, the scarcity of nutrients such as ammonia, glucose, phosphate can trigger sporulation and protein synthesis (Liu and Tzeng 2000). However, the fortified medium has excess of sucrose, glucose and fructose, which would ensure fulfillment of energy demand during the sporulation and synthesis of the crystal proteins. High availability of ATP would positively affect the synthesis of

spore and protein crystals (Rowe and Margiritis 1994; Ben kheder et al. 2014). The sporulation and synthesis of crystal proteins are phenomena that mobilize energy. Mazmira et al. (2012) showed that the presence of 8g/L of reducing sugars (glucose, fructose etc.) would trigger the synthesis of delta endotoxin at an advanced cell growth stage (Figure 3C). However, a high concentration of glucose (or other reducing sugar) would stop the synthesis of enzymes needed to metabolize complex carbon (Ghribi Dhouha et al. 2007).

In addition, endotoxins are composed of 95% protein and 5% carbohydrates. The presence of amino acids from the soybean medium, used to fortify SIW, such as glutamic acid and aspartic acid are essential for endotoxin synthesis and sporulation (Dharmsthiti et al. 1985; Kanjanamaneesathian, 2015). Some work has shown that gram-positive bacteria such as Btk was able to accumulate certain amino acids, which could be used later as an energy or protein source for sporulation and synthesis of crystal proteins (Gale and Taylor 1947; Conde et al. 2010).

Significant results in SIW fortified with soybean require further dilution, which resulted in a diluted formulation (F2d). This strategy produces high volume of diluted formulation and with entomotoxicity equivalent to non-fortified SIW medium and Foray 76 B (please refer to the entomotoxicity section).

Formulation

Fermented broth/cream optimization

When formulated, the cream obtained from centrifugation was concentrated in terms of total cell count (SIW: 3.16×10^9 CFU/mL; SIW fortified with soybean medium: 9.6×10^9 CFU/mL), viable spores count (SIW: 2.98×10^9 CFU/mL; SIW fortified with soybean medium: 8.95×10^9 CFU/mL) and endotoxins (SIW: 4224 μ g/mL; SIW fortified soybean: 9570 μ g/mL). The concentration of Btk active ingredient in centrifuged creams of SIW fortified with soybean and SIW alone fermented broth resulted in larvicidal potency exceeding 30 BIU/ha (30 BIU/ha for 1.5L) (Dang et al. 2009; Brar et al. 2006). While this potential has been described as sufficient to treat 1ha of forest area at a volume of 1.5L with Foray 76B biopesticide (Bauce Eric et al. 2004). These authors reported that when the same volume of biopesticide (1.5L) and the same forest area to be treated (1 ha) were used with a 50 BIU Foray 76B biopesticide, larval mortality results were similar to those obtained with 30 BIU/ha. In addition, the viscosity of SIW cream and SIW

fortified with soybean cream (obtained from centrifuging respective fermented broths) was 187 mPas and 198 mPas respectively. These viscosity values are above the optimum values for application (130-150 mPas). Thus, creams from SIW and SIW fortified with soybean were diluted with their respective fermented broth in different proportions. These dilutions were studied in terms of a cream-to-fermented broth ratio so that the total cells count, viable spores count, crystal proteins, entomotoxicity and viscosity in the different formulations (SIW, soybean fortified SIW and F2d) to be equivalent to commercial biopesticides (Table 4 and Table 5). This dilution also has the advantage of increasing the formulation volume produced, reducing the viscosity of the cream in the required range and also increasing the particle size. During centrifugation, the particles of the cream undergo shocks that reduce their size (SIW: 1.07 μ m, soybean fortified SIW 1.40 μ m). Thus, a direct addition of fermented broth to the cream provides an overall average D50 particle size relatively comparable to Foray 76B (Table 4).

pH and preservation against contamination

During transport or storage, Btk formulations may be subjected to contamination by microorganisms. Crystal proteins can also be solubilized and become inactive during these periods in alkaline media through proteolytic solubilization. Also, during application, volatile compounds such as aldehydes, ketones, carboxylic acids, etc. present on leaves may affect the formulation pH and inhibit the Bt active components (Smimoff, 1972; Ferry et al., 2004). In fact, at low and high pH, Btk active ingredients become inactive (Salama and Moris, 1993; Aranda et al. 2013). Ascorbic acid, propenoic acid and acetic acid at low concentrations have permitted (Table 4) to control the microbial contamination (Brar et al. 2006; Ndao et al. 2017). Acetic acid and sodium acetate form a buffer solution that stabilizes the pH of the formulations at 5. This buffer solution is bacteriostatic for many bacteria and stabilizes the pH of the formulation during application to foliage and during storage or transport.

Viscosity

Viscosity is a very important property and must be taken into account during application. It is among the parameters that influence the droplet size and their deposition on the treated surface. It has been described that low viscosity formulations below 100 mPas tend to produce small droplets and low deposition on treated surfaces when compared to low-volatility

formulations with higher viscosity (130-150mPas) (Hilz and arnoldus 2013; Harrison et al. 1999). When the droplets are small, two possibilities are considered:

- The quantity of the biopesticide in the droplet consequently decreases the active ingredient concentration. There is a cubic relationship between the droplet diameter and its volume. Reducing the diameter of droplets in a spray cloud by half will reduce the volume of each droplet by a factor of 8 (Dobson and King, 2002).
- The behaviour of the droplet, i. e. the place where it is carried away and the place where it is deposited. Small droplets may cause more drift or deposition out of the treated area. During the watercourses and agricultural activities in the area to be treated, controlling drift by optimizing viscosity is important.

Thus, in various formulations, thickening agents such as xanthan gum, carboxymethylcellulose (CMC), molasses and potassium silicate were studied. These agents are considered safe for human health, animals, the environment and biopesticide active ingredients (Brar et al. 2006). The different thickeners mentioned above have been proportioned according to the ratio of fermented broth/cream and the nature of the substrates (SIW and soybean fortified SIW) in order to obtain intervals of optimum viscosity (Table 4) comparable to Foray 76B (Adjallé et al. 2011).

Entomotoxicity

Btk entomotoxicity is an essential measure to determine the effectiveness of a Btk formulation. Entomotoxicity depends on several factors:

- Larvae: Btk is effective against larvae of lepidoptera and certain diptera and beetles. The 3rd and 6th stage larvae are actively feeding larvae. For the application of the product to be effective, larvae should therefore be healthy and in the right period of maturation to feed (Masse et al. 2000).
- Organoleptic properties of the biopesticide: To encourage larvae to feed (phagostimulation), Btk-based biopesticides are often supplemented with nutrients such as sugar (energy), soya or molasses (taste and odour) (Broderick et al., 2000).
- The nature of crystal proteins: Crystal proteins contains endotoxins. Depending on the nature of the substrate, a) complex: sludge, starch wastewater or b) simple: semi-

synthetic medium, the virulent nature and endotoxins concentration in crystal proteins differ (Barnabé et al. 2009).

- Concentration of viable spores: The larvicidal action of Btk is based on action of crystal proteins attached to the receptors of the middle intestine of larvae. This action is in concomitance with the germination of the spores, which subsequently leads to septicemia in the larvae. Valero (1990) indicates that a biopesticide containing both crystal proteins and spores is 4 times more effective than a biopesticide containing either.
- Other virulence factors: Btk synthesizes other virulence factors that are poorly studied, such as proteases, insecticidal vegetative proteins (acting as crystals protein on other receptors), chitinases and other zwittermicin. These soluble compounds mixed with cream at different ratios have shown a positive effect on Btk's larvicidal properties (Adjalle et al. 2011; Dang et al. 2009).

Entomotoxicity determined for the different media presented in Table 5 is in the following order: SIW fortified with soybean > SIW fortified with soybean diluted (F2d)> SIW > Foray 76B > SIW fortified with soybean (fermented broth)> SIW fermented broth> Btk sander's. Results from the SIW fortified with soybean formulation demonstrate that high concentration of Btk active ingredient found in this formulation is a major factor in the higher entomotoxicity of biopesticide. While F2d formulation has total cells count, viable spores count and endotoxin concentrations slightly below that of SIW formulation. However, entomotoxicity determined for F2d was higher than SIW. These results may be explained by the presence of more larvicidal crystals in F2d formulation. Also, the presence of soybean and sugar in this medium could lead to phagostimulation of larvae when compared to the SIW medium (Bauce Eric et al. 2004). It should also be noted that entomotoxicity of SIW formulation is superior to Foray's despite of higher concentration of total cells count, viable spores count and endotoxin in Foray 76B. These results reflect the data obtained by Barnabé et al. (2009), who reported that entomotoxicity using municipal secondary sludge as substrate was superior to Foray 76B. The complex components present in non-conventional substrates such as sludge or wastewater resulted in virulent, lethal protein crystals containing high concentrations of endotoxin when compared to formulations prepared from the fermented broths of easily biodegradable substrates. Fermented broths have inferior entomotoxicity to formulations. In fact formulations has higher concentration of active ingredients (by centrifugation) and possesses phagostimulant that stimulate larvae's appetite.

U.V half life

The half-life of entomotoxicity ($T_{x_{0.5}}$) was determined for SIW creams, SIW fermented broth, SIW fortified with soybean fermented broth, SIW fortified soybean cream as well as for the formulations of SIW, SIW fortified with soybean, F2d, Foray 76B and Btk sander's (Table 6). The observed results showed that when the fermented broth was not centrifuged or formulated, the half-life of the fermented broth was lower than that obtained in soybean fortified SIW cream and SIW cream. Creams contain more active ingredients than fermented broths and concentration of fermented broth provides an important larvicidal potential in creams. Further, after centrifugation, the concentration of suspended solids (SIW and soybean particles) increased in the cream, which provided a protective barrier against ultraviolet rays (Brar et al 2006). When formulations (SIW, SIW fortified soybean, F2d) mixed with UV protective agents (mixture) were exposed to ultraviolet rays, the half-life obtained was much higher than those of commercial formulations. Brar et al. (2005) mentioned the presence of chromophore such as hymathomelanic acid in formulations of unconventional (sludge, wastewater) media. This molecule would participate in the protection of Btk's active ingredients against UV radiation. While molasses present in the formulations forms a protective layer against the harmful effects of U.V. radiation. Studies showed that molasses has antioxidant activity. It would protect viable spores, DNA and oxidation of crystal proteins (Guimaraes et al. 2007; Hadapad 2009). The half-life of SIW fortified with soybean formulation was higher than SIW and F2d. Formulation of SIW fortified with soybean is concentrated in Btk's active ingredient. It also has chromophores and high suspended solids concentrations that offer superior larvicide properties and UV protection to the formulated product. When this medium was diluted (F2d), the suspended solids, cell concentrations, viable spores and crystals proteins obtained were equivalent to SIW formulation as well as the resulting $T_{x_{0.5}}$. This indicates that there is a correlation between suspended solids, Btk's active ingredients and the protective effect against ultraviolet radiation.

Suspending agent

Suspension results showed high suspensions between 95 and 98% for formulated SIW, formulated SIW+soybean, F2d, Foray 76B formulations (Figure 4). While the C. SIW (SIW formulation control) and the C. SIW+soybean (SIW+soybean formulation control) without

addition of sorbitol had suspensions of 77% and 79% respectively. Sorbitol is described as a stabilizer and sequestering agent. Its structure contains hydroxyl radicals (OH⁻) which leads to bonding with cations at an acidic pH (formation of H₃O⁺: studied formulations have pH 5). These bonds decrease the availability of positive charged ions, molecules and polymers, while negative charges become predominant. At the concentration of sorbitol studied, the sorbitol-complex particles and the excess free sorbitol in the solution repel each other, creating a state of suspension or dispersion in the solution (Smirnof and Valero 1983). Table 4 shows the zeta potential value of the different formulations. These values reflect the balance between the repulsive and attractive forces between particles in solution (Ndao et al. 2017).

Moreover, the addition of sorbitol provides stabilization by binding to proteins and provides cryo-protection for formulation (all studied formulations have high protein content). According to Petersen et al (2004), this cryoprotection promotes formulation stability at low temperatures.

Rainsfatness

Table 7 shows Btk total cell counts of different formulations from fermented broths of SIW alone, SIW fortified with soybean, F2d and control formulations after spraying on balsam fir branches. The control formulation has no Btk suspension. After one hour of suspension, three different Btk formulations showed total cell counts in excess of 300 CFU/mL on a balsam fir branch, impregnated on a nutrient agar. From 24h to 48h of culture, without watering, the count of total cells remains important. While on Day 5, an artificial rain of 300mL was simulated, the total cell count decreased from 220 CFU/mL to 180 CFU/mL for the F2d formulation, 180 CFU/mL for the SIW formulation and 230 CFU/mL for the SIW fortified with soybean formulation. The trees were no longer watered for up to a week of cell count. Thus, total cell counts analysis was 125 CFU/mL for the F2d formulation, 100 CFU/mL for the SIW formulation, 150 CFU/mL for SIW fortified soybean at 7 days.

With this experiment, it was possible to measure for the first time the adhesiveness of the different formulations developed on balsam fir trees, attacked by spruce budworms.

These results demonstrated the persistence of the formulations and their resistance to ultraviolet rays, precipitation and volatile substances (antibiotic properties) that are constantly emitted by conifers to protect against invasive organisms (bacteria, fungi and other) (Guenther

et al. 1995; Ehn et al. 2014). Among these volatile substances of conifers, acetylene, pinene, bornyl acetate, phellandrene and thujone are listed as antibacterial agents (Isidorov et al. 1985; Guenther et al. 2013). The buffering power of the formulation conferred by sodium acetate and acetic acid enabled it to resist volatile substances and their effect on pH. While the presence of molasses, xantham gum as thickening agent ensured adhesion of the formulation to the branches despite rainfall. The adhesive property of molasses resulted from the sugar content, which formed cohesive bonds when molasses dried up on the surface. Also the polymeric chains of amino acids in molasses tend to form a contiguous three-dimensional network in solution. This network is likely to trap water within its structure and resists precipitation washout (Xu et al. 2005). McGuire et al. (1994) have also shown that starch-based formulations can increase biopesticide persistence and Bt entomotoxicity as starch particles enhanced adhesive properties of the formulation.

Conclusion

This study made it possible to produce a biopesticide formulations with high entomotoxicity by fortifying starch industry wastewater with a soybean medium of 25% strength. This entomotoxicity is attributed to the presence of high concentration of carbohydrate and nitrogen source, which increased Btk cell growth, sporulation and crystal protein synthesis. The high potential of this formulation needs further dilution and results in a diluted formulation with an entomotoxicity equivalent to the commercial product (Foray 76B formulation). The suspended solids, the nature of the substrate and Btk active ingredient present in industrial starch wastewater provided an important half-life against UV in SIW-based formulations. While the presence of suspending agents such as sorbitol has proven to be effective in dispersion of formulation particles. In addition, adjuvants like molasses, xantham ghum and carboxymethylcellulose have been used to achieve an optimal viscosity for biopesticide application.

Reference

- Adjallé, K. D., Vu, K. D., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2011). Optimization of spray drying process for *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(2), 237-246.
- Aranda, E., Lorence, A., & del Refugio Trejo, M. (2013). Rural production of *Bacillus thuringiensis* by solid. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, 317
- Barnabé, S., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Beauchesne, I., & Surampalli, R. Y. (2009). Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the total environment*, 407(5), 1471-1488.
- Bauce, É., Carisey, N., Dupont, A., & van Frankenhuyzen, K. (2004). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology*, 97(5), 1624-1634.
- Ben Khedher, S., Jaoua, S., & Zouari, N. (2014). Overcome of carbon catabolite repression of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* through adequate fermentation technology. *Biotechnology research international*, 2014.).
- Blais, J. R. 1983. Trends in the frequency, extent, and severity of spruce budworm outbreaks in eastern Canada. *Can. J. For. Res.* 13: 539-617.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2005). Starch industry wastewater-based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of economic entomology*, 98(6), 1890-1898
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Screening of different adjuvants for wastewater/wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulations. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1065-1079.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water research*, 40(6), 1310-1320.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Broderick NA, Goodman RM, Raffa KF, Hande1sman J. Synergy Between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Against Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ Entomol*2000; 29(1): 101-107.
- Conde, A., Diallinas, G., Chaumont, F., Chaves, M., & Gerós, H. (2010). Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 857-868.).
- Carrow, J. R. 1983. B.T. and the spruce budworm - 1983. New Brunswick Department of Natural Resources, Fredericton, New-Brunswick, Canada.
- Dang, V.K., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y. Starch industry wastewater for production of biopesticides—Ramifications of solids concentrations. *Environ technol.* 2009, 30: 393-405.

De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4), 193-199

Devidas, Patil Chandrashekhar, Borase Hemant Pandit, and Patil Satish Vitthalrao. "Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*." *The Scientific World Journal* 2014 (2014).

Dharmsthiti, Saovane C., Somsak Pantuwatana, and Amaret Bhumiratana. "Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory." *Journal of Invertebrate Pathology* 46.3 (1985): 231-238.

Dobson, Hans, and William King. "Pesticide Application: Mastering And Monitoring." *Ecological Monitoring Methods for the Assessment of Pesticide Impact in the Tropics*. Chatham, UK: Natural Resources Institute (2002): 1-20.).

Dulmage, H. T., Boening, O. P., Rehnborg, C. S., & Hansen, G. D. (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *Journal of invertebrate pathology*, 18(2), 240-245.

Dymond, C. C., Neilson, E. T., Stinson, G., Porter, K., MacLean, D. A., Gray, D. R., ... & Kurz, W. A. (2010). Future spruce budworm outbreak may create a carbon source in eastern Canadian forests. *Ecosystems*, 13(6), 917-931

EHN, Mikael, THORNTON, Joel A., KLEIST, Einhard, *et al.* A large source of low-volatility secondary organic aerosol. *Nature*, 2014, vol. 506, no 7489, p. 476.).

Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse, AMR. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnol*2004; 15: 155-161.

Gale, E. F., and E. Shirley Taylor. "The Assimilation of Amino-acids by Bacteria: 2. The Action of Tyrocidin and some Detergent Substances in Releasing Amino-acids from the Internal Environment of *Streptococcus faecalis*." *Microbiology* 1.1 (1947): 77-84.

Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., ... & Chaabouni-Ellouze, S. (2012). Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *BioMed Research International*, 2012.

Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2014). Corrosion and stability study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* starch industry wastewater-derived biopesticide formulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(11), 889-896.

Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T. & Pierce, T. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 100(D5), 8873-8892.

Guenther, Alex. "Biological and chemical diversity of biogenic volatile organic emissions into the atmosphere." *ISRN Atmospheric Sciences* 2013 (2013)..

GUIMARAes, C. M., Glao, M. S., Martinez, S. S., Pintado, A. I., Pintado, M. E., Bento, L. S., & Malcata, F. X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *Journal of food science*, 72(1).

- Hadapad, A. B., Hire, R. S., Vijayalakshmi, N., & Dongre, T. K. (2009). UV protectants for the biopesticide based on *Bacillus sphaericus* Neide and their role in protecting the binary toxins from UV radiation. *Journal of invertebrate pathology*, 100(3), 147-152.
- Harrison, G. M., Mun, R., Cooper, G., & Boger, D. V. (1999). A note on the effect of polymer rigidity and concentration on spray atomisation. *Journal of non-newtonian fluid mechanics*, 85(1), 93-104.
- Hilz, Emilia, and Arnoldus WP Vermeer. "Spray drift review: the extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction." *Crop Protection* 44 (2013): 75-83
- Isidorov, V. A., I. G. Zenkevich, and B. V. Ioffe. "Volatile organic compounds in the atmosphere of forests." *Atmospheric Environment (1967)* 19.1 (1985): 1-8.
- Kanjanamaneesathian, Mana. "Bacillus for Rice Cultivation in Thailand." *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas*. Springer, Cham, 2015. 81-100
- Lisansky, S. G., Quinlan, R., & Tassoni, G. (1993). *Bacillus thuringiensis* production handbook: laboratory methods, manufacturing, formulation, quality control, registration. CPL Scientific Ltd.
- Liu, C.M. & Tzeng, Y.M. 2000. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 68(1),11-17.
- Masse´, A., K. van Frankenhuyzen, and J. Dedes. 2000. Susceptibility and vulnerability of third-instar larvae of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Can. Entomol.* 132: 573D580.
- Mazmira, M. M., Ramlah, S. A. A., Rosfarizan, M., Ling, T. C., & Arliff, A. B. (2012). Effect of saccharides on growth, sporulation rate and δ -endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9654-9663.
- Ndao, A., Sellamuthu, B., Gnepe, J. R., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2017). Pilot-scale biopesticide production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* using starch industry wastewater as raw material. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(9), 623-630.
- Pazhang, M., Mehrnejad, F., Pazhang, Y., Falahati, H., & Chaparzadeh, N. (2016). Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. *Biotechnology and applied biochemistry*, 63(2), 206-213.
- Rowe, G. E., & Margaritis, A. (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*. *Biotechnology and bioengineering*, 86(4), 377-388.
- Salama HS, Morris ON. The use of Bt in developing countries, pp. 237-254. *In* P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S.Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley and Sons, Chichester, England, 1993.
- Sarrafzadeh, Mohammad Hossein. "Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by plackett-burman method." *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)* 31.4 (2012): 131 136.
- Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

Smirnov WA, Valéro, JR. Characteristics of a highly concentrated *Bacillus thuringiensis* formulation against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can Ent* 1983; 115:443-444.

Smirnov, W. A., and A. Juneau. "Physical analysis of the dispersion of *Bacillus thuringiensis* [bacterial insecticide] against spruce budworm." *Information Report Canadian Forestry Service (Canada)*. no. LAJ-X-55. (1982).

Smirnov W A. Effects of volatile substances released by foliage of *Abies balsamea*. *J Invertebr Pathol* 1972; 19(1): 32-35.

Tyagi, R. D., Foko, V. S., Barnabe, S., Vidyarthi, A. S., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, 46(10), 247-254.

Valero JR (1990) Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec. L'Aubelle 12-15

van Frankenhuyzen, K., Lucarotti, C., & Lavallée, R. (2016). Canadian contributions to forest insect pathology and to the use of pathogens in forest pest management. *The Canadian Entomologist*, 148(S1), S210-S238.

Xu, Y., S. Barringer, and V. Alvarez. 2005. Cause and prevention of cane molasses gelling. *J. Food Sci.* 70(8):C461-464.

Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource technology*, 97(15), 1850-1857.

Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R., & Valéro, J. R. (2014). Wastewater sludge as raw material for microbial oils production. *Applied Energy*, 135, 192-201.

Zouari, N., and S. Jaoua. "The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23.6 (1999): 497-502.

Table 1: SIW characteristics-Suggested wavelength and estimated detection limit for minerals selected by ICP-AES axial Vista

Minerals	Suggested wavelength (nm)	Estimated detection limit (mg/L)	Concentrations (mg/L)
AL	396.152	0.0013	13
As	193.696	0.0021	21
B	249.678	0.0006	7
Ba	455.403	0.0005	6
Ca	317.933	0.0022	2.890
Cd	214.439	0.0001	<1
Co	238.892	0.0003	<3
Cr	267.716	0.00018	5
Cu	324.754	0.0011	11
Fe	238.204	0.00017	100
K	766.491	0.0016	19.500
Mg	279.553	0.00018	5.700
Mn	257.610	0.00004	56.1
Mo	202.032	0.0007	8
Na	588.995	0.0019	33.100
Ni	231.604	0.0007	7
P	177.434	0.003	15.800
Pb	220.353	0.0015	15
S	181.972	0.007	6.100
Sb	217.582	0.003	30
Sc	335.372	0.00008	5.7
Se	196.026	0.005	50
Sn	189.925	0.0018	18
Sr	407.771	0.00017	3
Ti	337.280	0.00011	4
V	292.401	0.0004	4
Zn	206.200	0.0004	37
Physical and chemical characteristics			
Total organic carbon (mg/L)	4990		
Total organic nitrogen (mg/L)	460		
Ammonia nitrogen (mg-N/L)	20.1		
pH	3.5		
Suspended solids (g/L)	4.05		

Table 2: Composition of standard soybean medium and 25% soybean medium fortified in SIW

Standard soybean medium	Concentration (100%) g/L	Concentration (25%) g/L
CaCO ₃	2	-
FeSO ₄	0.04	-
Glucose	10	2.5
K ₂ HPO ₄	2	-
KH ₂ PO ₄	2	-
MgSO ₄	0.6	-
Soybean flour	30	7.5
Starch	10	2.5

Table 3: Composition of reducing sugars present in SIW control and SIW fortified with synthetic soybean medium by LC-MS-MS.

		Glucose (mg/L)	Fructose (mg/L)	Lactose (mg/L)	Sucrose (mg/L)	Galactose (mg/L)	Xylose (mg/L)
Detection Limit		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Time (h)	SIW control	940	290	<20	<20	<20	790
48	SIW control	<20	<20	<20	<20	<20	560
0	SIW +25% soya	2500	780	<20	1300	<20	160
48	SIW + 25% soya	180	100	<20	1600	<20	170

Table 4: Concentration of different adjuvants, viscosity, particle size, zeta potential, total cells count, viable spores count, endotoxin concentration present in different formulations

Formulation → Adjuvants/suspension ↓	SIW control	SIW fortified with Soybean medium (25%)	F2d	Foray 76B	Btk sander's
Cream (L)	60	7	6	-	-
Propionic acid (L)	0.07	0.0077	0.01	-	-
Sorbitol (Kg)	1	0.11	0.13	-	-
Ascorbic acid (Kg)	0.01	0.0011	0.13	-	-
Carboxymethylcellulose (Kg)	0.15	0.0055	0.018	-	-
Xantham gum (Kg)	0.2	0.0055	0.018	-	-
Molasses (Kg)	0.3	0.0165	0.03	-	-
Potassium silicate (Kg)	0.25	0.0165	0.03	-	-
Sodium acetate (Kg)	1.7	0.0495	0.0525	-	-
Acetic acid (L)	0.25	0.0275	0.0525	-	-
Fermented Broth (L)	36	4	15	-	-
Total cells count (CFU/mL)	3.19×10^9 ± 0.2552	8.3×10^9 ± 0.664	3.05×10^9 ± 0.244	4.2×10^9 ± 0.336	2.45×10^9 ± 0.196
Viable spores count (CFU/mL)	2.95×10^9 ± 0.236	7.8×10^9 ± 0.624	2.85×10^9 ± 0.228	3.7×10^9 ± 0.296	2.35×10^9 ± 0.188
Endotoxin (µg/mL)	2951 ± 147.55	7442 ± 372.1	2850 ± 142.5	3100 ± 155	2500 ± 125
Viscosity cP ou mPas	185 ± 9.25	137 ± 6.85	130 ± 6.5	135 ± 6.75	240 ± 12
Particle size D 50: µm	1.58 ± 0.1264	1.67 ± 0.1336	2.06 ± 0.1648	1.28 ± 0.1024	1.44 ± 0.1152
Zeta Potential (mV)	-30 ± 2.7	-35 ± 3.15	-35 ± 3.15	-30 ± 2.7	-35 ± 3.15

Table 5: Entomotoxicity of different formulation

Formulation	Entomotoxicity (IU/ μ L)
SIW (control)	21000 \pm 1680
SIW fortified with soybean medium	38000 \pm 3040
F2d	21500 \pm 1720
Btk's sanders	12500 \pm 1000
Foray 76B	20000 \pm 1600
SIW (Fermented broth)	15000 \pm 1200
SIW fortified with soybean (fermented broth)	18000 \pm 1440

Table 6: Entomotoxicity Half-life of different formulations (Tx 0.5)

Substrates	Half-life (days)
SIW	10 ± 0.5
SIW fortified soybean	12.5 ± 0.625
F2d	10 ± 0.5
Btk's sanders	6 ± 0.3
Foray 76B	7 ± 0.35
SIW fermented broth	3 ± 0.15
SIW fortified with soybean medium fermented broth	4 ± 0.2
SIW batch centrifuged cream	5 ± 0.25
SIW fortified with soybean medium batch centrifuged cream	6 ± 0.3

Table 7: Rainfastness test using different formulations

Total cell count on balsam fir branch (CFU/mL)				
Time	F2d	SIW	SIW fortified with soybean medium	Control (adjuvants in water without Btk ingredients)
1 h	$>300 \pm 15$	$>300 \pm 15$	$>300 \pm 15$	$<20 \pm 1$
24 h	$>300 \pm 15$	$>300 \pm 15$	$>300 \pm 15$	$<20 \pm 1$
48 h	220 ± 11	200 ± 12.5	250 ± 12.5	$<20 \pm 1$
5 d	180 ± 9	180 ± 9	230 ± 11.5	$<20 \pm 1$
7 d	125 ± 6.25	100 ± 5	150 ± 7.5	$<10 \pm 0.5$



Figure 1: Rainfastness test in young balsam fir



Figure 2: Evaluation of adhesiveness by impregnating needles of balsam fir trees on TSA agar

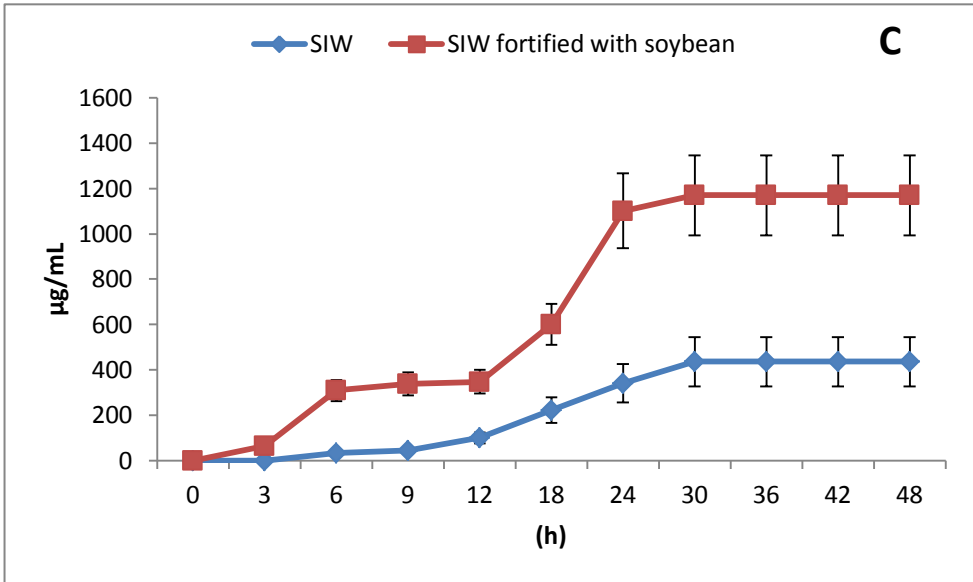
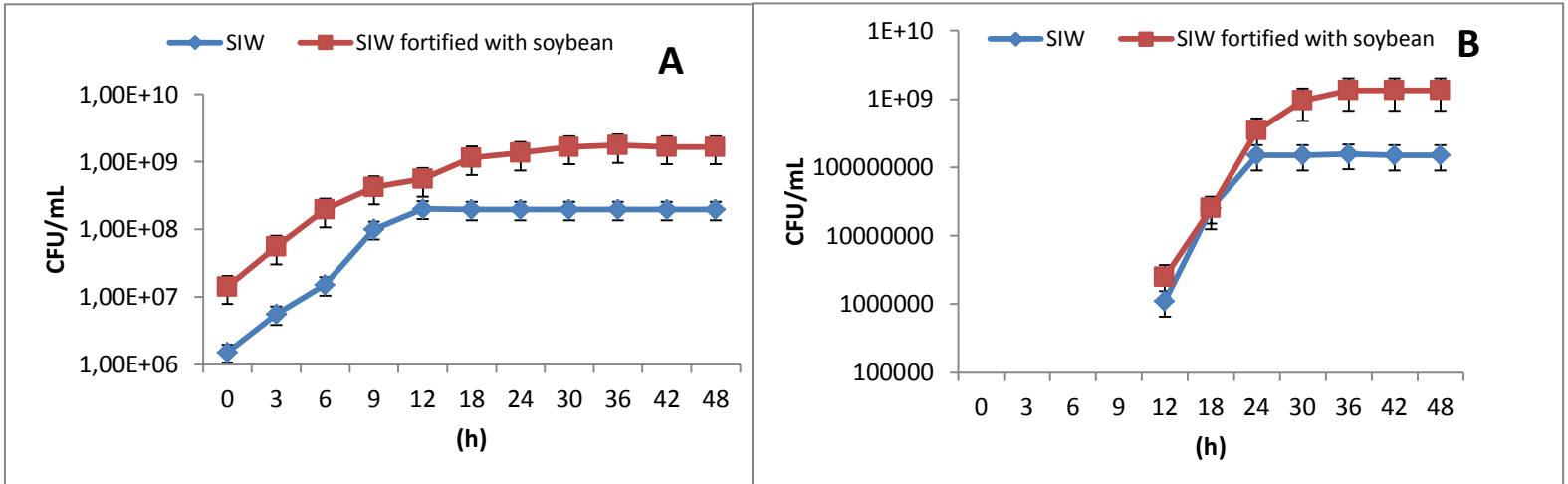


Figure 3: Btk profile: a) total cell count in SIW and SIW fortified with soybean medium, (b) viable spores count in SIW control and SIW fortified with soybean medium, (c) endotoxin concentration in SIW and SIW fortified with soybean medium

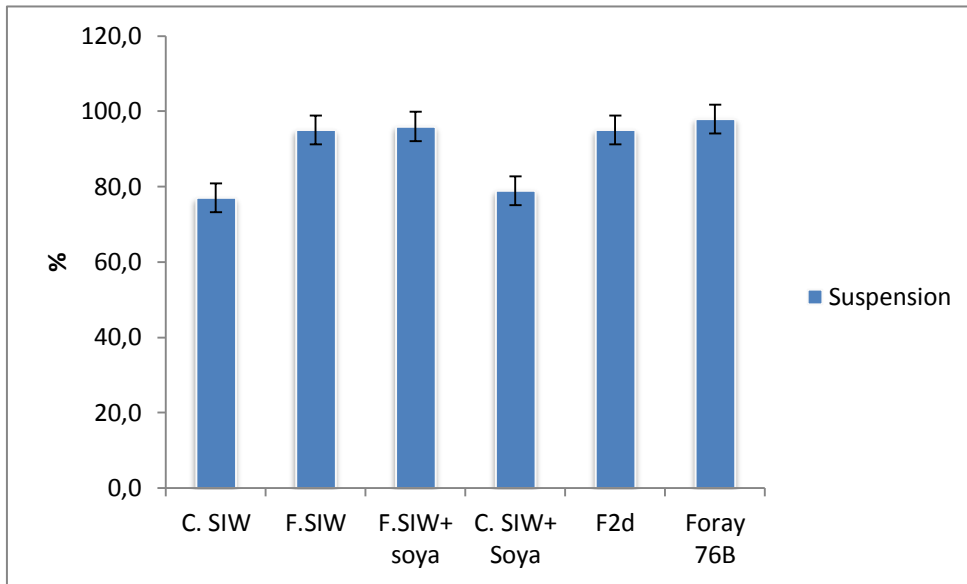


Figure 4: Suspendibility of different formulations: control SIW sorbitol free (C.SIW), SIW only (F.SIW), SIW fortified with soybean medium (F.SIW+ Soya), SIW fortified soybean sorbitol free (C.SIW+soya), F2d and Foray 76B

Annexes

Optimisation des acides aminés

- **Compte des spores viables** (ecart-type : 8%)

Temps (H)	acide aspartique			
	0.1 g/L (CFU/mL)	0.2 g/L CFU/mL	0.4 g/L CFU/mL	Contrôle CFU/mL
0	2.50E+06	2.60E+06	2.50E+06	1.63E+06
3	2.80E+06	3.00E+06	3.10E+06	2.30E+06
6	5.80E+06	1.20E+07	5.50E+06	9.30E+06
9	1.50E+07	2.50E+07	1.60E+07	1.50E+07
12	5.50E+07	1.00E+08	6.50E+07	4.50E+07
18	1.60E+08	3.50E+08	1.90E+08	1.50E+08
24	3.50E+08	3.50E+08	3.50E+08	4.90E+08
30	5.50E+08	6.30E+08	6.50E+08	6.10E+08
36	5.50E+08	6.30E+08	6.50E+08	6.10E+08
42	5.50E+08	6.30E+08	6.50E+08	6.10E+08
48	5.50E+08	6.30E+08	6.50E+08	6.10E+08

Temps (H)	Glutamate			
	0.1 g/L CFU/mL	0.2 g/L CFU/mL	0.4 g/L CFU/mL	Contrôle CFU/mL
0	2.50E+06	3.50E+06	3.30E+06	1.63E+06
3	3.00E+06	3.50E+06	3.70E+06	2.30E+06
6	1.05E+07	1.05E+07	1.10E+07	9.30E+06
9	3.50E+07	3.50E+07	3.50E+07	1.50E+07
12	1.10E+08	1.15E+08	1.15E+08	4.50E+07
18	2.40E+08	2.50E+08	2.50E+08	1.50E+08
24	4.50E+08	5.50E+08	5.50E+08	4.90E+08
30	6.10E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
36	6.10E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
42	6.10E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
48	6.10E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08

Temps (H)	Acide glutamique		
	0.1 g/L CFU/mL	0.2 g/L CFU/mL	0.4 g/L CFU/mL
0	3.60E+06	3.60E+06	3.60E+06
3	4.00E+06	4.00E+06	4.00E+06
6	1.30E+07	1.00E+07	1.10E+07
9	4.50E+07	4.10E+07	4.00E+07
12	1.30E+08	1.40E+08	1.30E+08
18	2.50E+08	2.20E+08	2.00E+08
24	5.50E+08	5.00E+08	4.50E+08
30	6.40E+08	6.30E+08	5.40E+08
36	6.40E+08	6.30E+08	5.40E+08
42	6.40E+08	6.30E+08	5.40E+08
48	6.40E+08	6.30E+08	5.40E+08

	Acide Aspartique- Acide glutamique- Glutamate			
Temps (H)	0.1 g/L CFU/mL	0.3 g/L CFU/mL	0.4 g/L CFU/mL	Controle CFU/mL
0	3.15E+06	3.30E+06	3.50E+06	1.63E+06
3	3.50E+06	3.60E+06	3.80E+06	2.30E+06
6	1.80E+07	1.70E+07	1.75E+07	9.30E+06
9	5.50E+07	5.60E+07	5.50E+07	1.50E+07
12	1.50E+08	1.50E+08	1.40E+08	4.50E+07
18	2.40E+08	2.50E+08	2.50E+08	1.50E+08
24	5.50E+08	5.30E+08	5.40E+08	4.90E+08
30	6.40E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
36	6.40E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
42	6.40E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08
48	6.40E+08	6.40E+08	6.30E+08	6.10E+08

- **Concentration des endotoxines (Ecart-type : 9%)**

Temps (H)	Acide aspartique			Controle µg/mL
	0.1 g/L µg/mL	0.2 g/L µg/mL	0.4 g/L µg/mL	
0	0	0	0	0
3	39	41	41	45
6	98	98	100	104
9	113	125	135	140
12	170	195	205	187
18	410	490	515	448
24	507	550	570	519
30	507	550	570	519
36	507	550	570	519
42	507	550	570	519
48	507	550	570	519

Temps (H)	Glutamate			
	0.1 g/L µg/mL	0.2 g/L µg/mL	0.4 g/L µg/mL	Controle µg/mL
0	0	0	0	0
3	41	41	51	45
6	105	95	105	104
9	175	165	170	140
12	225	215	225	187
18	535	530	540	448
24	560	570	580	519
30	560	570	580	519
36	560	570	580	519
42	560	570	580	519
48	560	570	580	519

Temps (H)	Acide glutamique			
	0.1 g/L µg/mL	0.2 g/L µg/mL	0.4 g/L µg/mL	Controle µg/mL
0	0	0	0	0
50	55	40	45	45
110	105	95	104	104
165	145	135	140	140
225	205	205	187	187
525	525	496	448	448
555	565	555	519	519
560	565	555	519	519
560	565	555	519	519
560	565	555	519	519
560	565	555	519	519

Temps (H)	Acide glutamique-Acide aspartique- Glutamate			
	0.1 g/L µg/mL	0.3 g/L µg/mL	0.4 g/L µg/mL	Controle µg/mL
0	0	0	0	0
3	40	45	50	45
6	100	104	105	104
9	165	175	185	140
12	260	284	280	187
18	510	566	560	448
24	570	602	605	519
30	570	602	605	519
36	570	602	605	519
42	570	602	605	519
48	570	602	605	519