

Université du Québec
INRS-Eau

**UTILISATION DES BOUES DES USINES DE
TRAITEMENT COMME MOYEN ALTERNATIF
POUR LA PRODUCTION DE L'INSECTICIDE
MICROBIEN *BACILLUS THURINGIENSIS***

Par

María de Lourdes Tirado Montiel
(Maîtrise en Génie Environnemental)

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiae doctorat (Ph.D.)
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

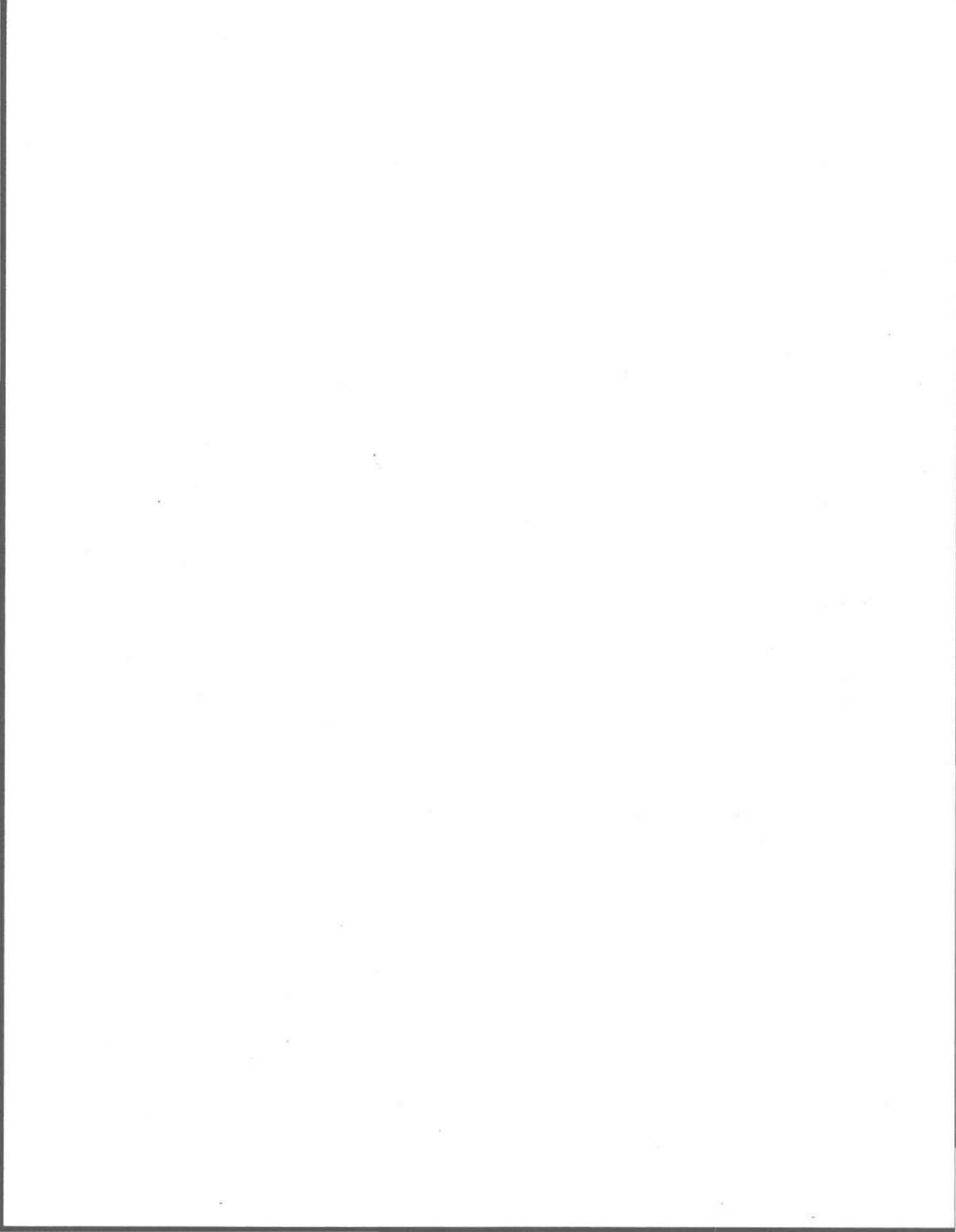
Président du jury et examinateur externe	M. Yves Comeau, professeur Département de génie civil École Polytechnique de Montréal
Examineur externe	M. Robert Letarte, professeur Département de biologie médicale Université Laval
Examineur interne	M. Jean-Christian Auclair, professeur INRS-Eau
Examineur interne et codirecteur de recherche	M. José Valéro Professeur invité INRS-Eau
Directeur de recherche	M. R. D. Tyagi, professeur INRS-Eau

Thèse soutenue le 28 octobre, 1997



À mes parents, Lourdes et Ramón †,

à mon oncle Víctor



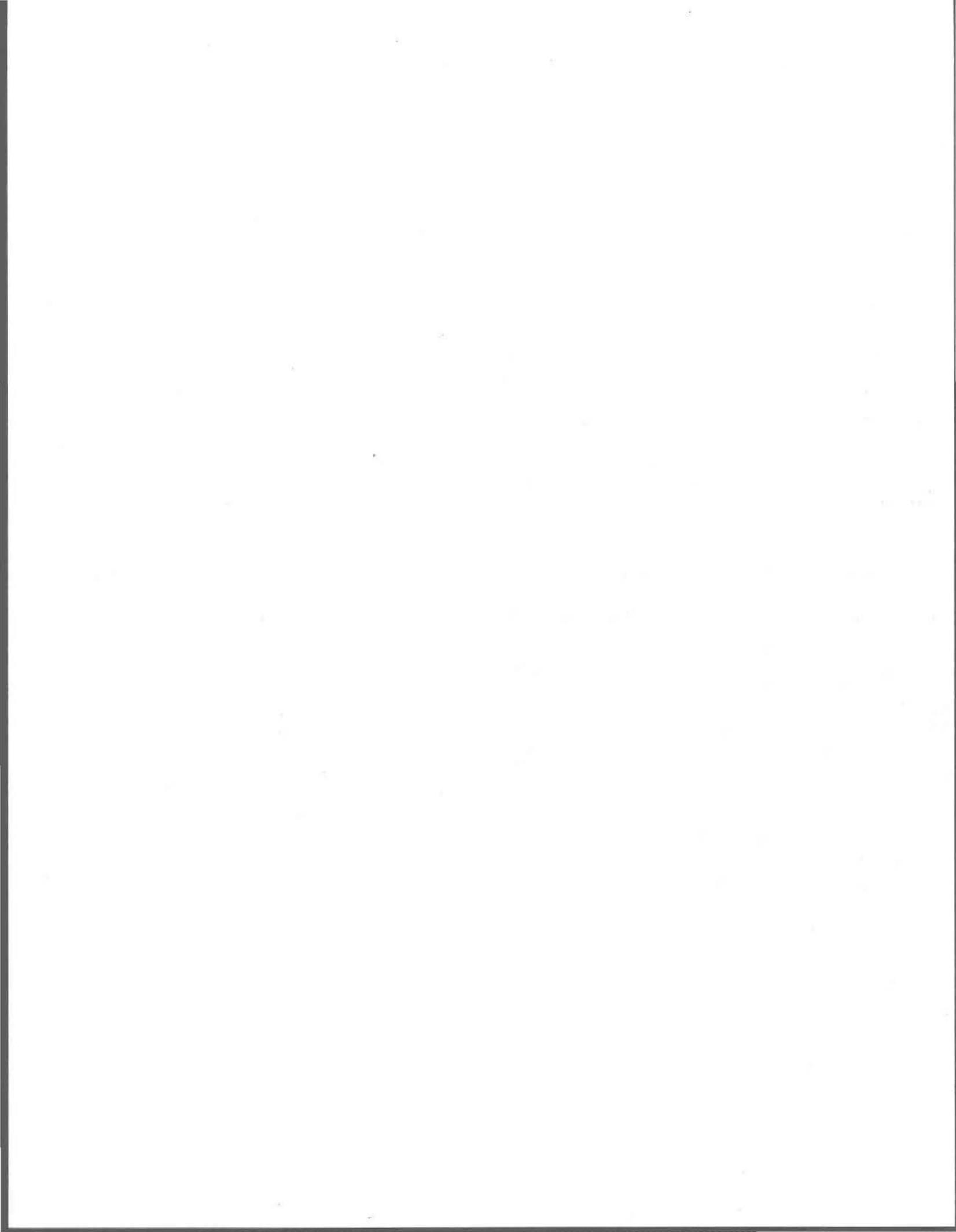
REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de thèse le Dr R. D. Tyagi pour l'attention qu'il a bien voulu m'accorder pendant la réalisation de ces travaux de recherche. Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr José R. Valéro mon codirecteur de thèse pour la confiance et le soutien qu'il m'a témoigné tout au long du temps que j'ai passé au Québec. Je remercie le Dr J. C. Auclair pour son appui et les commentaires pertinents qu'il m'a livrés.

Je remercie les autorités du Centre de Foresterie des Laurentides, Service Canadien des Forêts à Québec, en particulier le Dr Michel Boudoux, directeur de recherches pour m'avoir permis de réaliser la plupart de mes travaux dans ce centre. Au Dre Sylvie Bourque un grand merci pour son encouragement, son amitié et ses précieux conseils qui m'ont aidée tout au long de ces années. Je tiens à souligner aussi l'aide technique que Mme Nicole Lecours m'a fournie pour la réalisation d'une partie de ces travaux.

J'aimerais souligner le soutien financier du Ministère de l'Éducation du Québec pour la bourse d'excellence qu'il m'a octroyée et qui m'a permis de réaliser ces travaux de recherche.

Finalement, je voudrais remercier toutes les personnes ayant d'une façon ou d'une autre participé à la réalisation de ce projet.



RÉSUMÉ

L'utilisation des boues d'épuration comme milieu alternatif de culture pour la production du biopesticide *B. thuringiensis* a été évaluée en tenant compte que celles-ci contiennent des éléments pouvant soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine. Dans ces expériences la souche employée était *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 qui est la bactérie la plus utilisée pour lutter contre un grand nombre des larves de lépidoptères. Au Québec elle est employée pour contrôler la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

La première étape de ce projet consistait à tester des boues de différents types et origines. Ainsi, les expériences ont été réalisées avec la boue primaire de Valcartier (ValP), la boue secondaire de Black Lake (BLS), la boue secondaire digérée aérobiquement de Black Lake (BLDA), la boue secondaire de Sainte Claire (SCS), la boue secondaire de Beauceville (BVS), la boue secondaire d'une usine de pâtes et papiers (PPS) et la boue secondaire du réacteur à membranes de cette même usine de pâtes et papiers (PPRMS). Comme les conditions d'utilisation peuvent avoir une influence sur développement de la bactérie, chaque boue a été utilisée sous trois conditions de préparation, c'est-à-dire, sans prétraitement, avec prétraitement (hydrolyse à l'acide sulfurique) ou le surnageant seul des boues hydrolysées obtenu après une centrifugation. Le temps nécessaire pour atteindre la sporulation maximale de *B. thuringiensis* dans les boues a varié selon la préparation des boues, ce qui a eu une influence sur la disponibilité des nutriments. Dans les boues sans prétraitement la durée était de dix à onze jours. En utilisant les boues prétraitées, le temps a été réduit de huit à neuf jours, et avec les surnageants la durée était de quatre à six jours. Le pH initial de la boue joue un rôle important sur le développement de la bactérie; dans ces expériences en utilisant la boue primaire de Valcartier (ValP) sans prétraitement (pH=5.5), la bactérie n'a pas été capable de se développer, donc il a été constaté qu'un pH initial près de la neutralité peut améliorer la performance des boues. Le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus dans les fermentations réalisées avec les différentes boues, a été estimé par des bioessais en utilisant des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette comme insecte cible. L'hydrolyse de boues a eu un impact positif sur le potentiel entomotoxique, une activité plus élevée a été obtenue (4100 UI/ μ L) avec la boue secondaire de Black Lake (BLS) qu'avec le milieu de référence (farine de soja, 3800 UI/ μ L), tandis que l'utilisation des surnageants ne s'avère pas recommandable parce que les potentiels entomotoxiques des complexes spores-cristaux ont présenté des valeurs inférieures à celles rencontrés en utilisant les boues non hydrolysées et les boues hydrolysées.

L'influence du pH et de la température sur la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 ont été étudiées en utilisant la boue secondaire de Jonquière (JS). L'effet de ces deux paramètres a été évalué dans une première expérience en réalisant des fermentations entre 30 °C et 36 °C et en même temps en utilisant cette boue hydrolysée à différents pH. La deuxième expérience consistait à maintenir constant le pH pendant toute la fermentation à l'aide des tampon

TRIS et PBS. Une troisième expérience consistait à appliquer un choc thermique après avoir atteint la phase de croissance exponentielle de façon à promouvoir la sporulation de la bactérie. En général, c'est entre 30 °C et 32 °C que les potentiels entomotoxiques et les concentrations des complexes spores-cristaux plus élevés sont obtenus. Pour le pH, au moins pour la boue secondaire de Jonquière, l'hydrolyse ne semble pas avoir une influence sur le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus. Donc en utilisant cette boue comme milieu de culture il ne serait pas nécessaire d'effectuer l'hydrolyse, ce qui réduit le coûts de production du biopesticide. La croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine ont été affectées en utilisant les températures de 34 °C et 36 °C comme le démontrent les faibles taux maximaux spécifiques de croissance, les pourcentages de sporulation et les potentiels entomotoxiques des produits obtenus à ces températures. Il est donc fortement recommandable de ne pas réaliser les fermentations à ces températures et de travailler plutôt entre 30 °C et 32 °C. Le contrôle du pH réalisé à l'aide des tampons pendant les fermentations, a eu un impact bénéfique sur la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine. Les pourcentages de sporulation et les potentiels entomotoxiques des échantillons de la boue de Jonquière contenant les tampons ont augmenté par rapport à ceux de l'échantillon sans contrôle du pH. Il serait souhaitable de réaliser des études plus approfondies pour évaluer l'influence d'un choc thermique plus sévère que celui réalisé dans ces expériences où nous n'avons pas trouvé des améliorations au niveau des pourcentages de sporulation ou du potentiel entomotoxique.

L'influence de l'agitation sur la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* a été étudiée en réalisant des expériences à quatre niveaux d'agitation, soit à 50 rpm, 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm. Il a été constaté que quand les conditions d'aération ne sont pas adéquates (50 rpm), la croissance de la bactérie peut devenir lente et la sporulation inhibée, ce qui affecte le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux. C'est à 250 rpm que le potentiel entomotoxique plus élevé a été obtenu et en même temps les résultats ont démontré que le niveau d'agitation ne peut pas être augmenté indéfiniment, car le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus à 350 rpm présente une valeur inférieure à celles obtenus à 250 rpm; ce résultat peut s'expliquer par une inhibition par excès du substrat, dans ce cas de l'oxygène. La culture de la bactérie dans un bioréacteur où les conditions d'aération peuvent être contrôlées pourrait aider à clarifier ce point.

La boue secondaire de Black Lake (BLS) a été employée afin d'évaluer l'influence que l'addition des sources de nutriments peut avoir sur la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis*. Le glucose a été choisi comme source additionnelle de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote et de vitamines. Initialement la boue a été enrichie de glucose, dont les concentrations variaient entre 40 mg/L et 200 mg/L. Il a été observé une réduction du temps nécessaire pour atteindre la sporulation maximale dans les échantillons additionnés de glucose (5 jours) par rapport à l'échantillon qui n'en contenait pas (10 jours) et aussi une augmentation du pourcentage de sporulation dans les échantillons contenant le glucose. Les potentiels entomotoxiques se sont aussi améliorés à mesure que la concentration du glucose a augmenté. Ils ont

varié de 3300 UI/ μ L pour la concentration plus faible de glucose employée (40 mg/L) jusqu'à 5300 UI/ μ L pour la concentration de glucose la plus élevée ajoutée à la boue (200 mg/L). L'addition de l'extrait de levure (40 mg/L) en plus du glucose, a augmenté les potentiels entomotoxiques des complexes spores-cristaux obtenus, entre 3500 UI/ μ L et 6600 UI/ μ L. Le temps pour atteindre la sporulation maximale est resté le même que dans les expériences réalisées seulement avec l'addition du glucose (5 jours). Ces expériences ont montré qu'en variant la composition de la boue par l'addition de certains substrats, sa performance pour soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* peut être améliorée.

La stabilité des caractéristiques génétiques au niveau des gènes qui codent pour l'activité insecticide des cristaux produits par *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, quand la bactérie a été cultivée dans des boues d'épuration, a été vérifiée par l'utilisation de la polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques pour chacun des gènes. Dans tous les échantillons analysés, les gènes CryIA(a), CryIA(b) et CryIA(c) qui codent pour l'entomotoxicité des cristaux produits pendant la sporulation chez cette variété, ont été identifiés. Ce fait indique que *B. thuringiensis* peut être cultivé dans les boues d'épuration sans affecter ses caractéristiques génétiques au niveau de ces trois gènes.

L'utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production du biopesticide *B. thuringiensis* semble une alternative intéressante du point de vue de leur recyclage. D'un autre côté, l'utilisation des boues d'épuration pour la production de ce bioinsecticide peut aider à réduire ses coûts de production, ce qui aidera à augmenter son utilisation pour contrôler certains insectes nuisibles. Des expériences en utilisant d'autres souches de *B. thuringiensis* pourraient augmenter le spectre d'utilisation des boues comme milieu de culture.

Les résultats obtenus au cours de ces recherches ont fait l'objet d'une demande de brevet international ainsi qu'aux États Unis. Le brevet international étant déjà accepté.

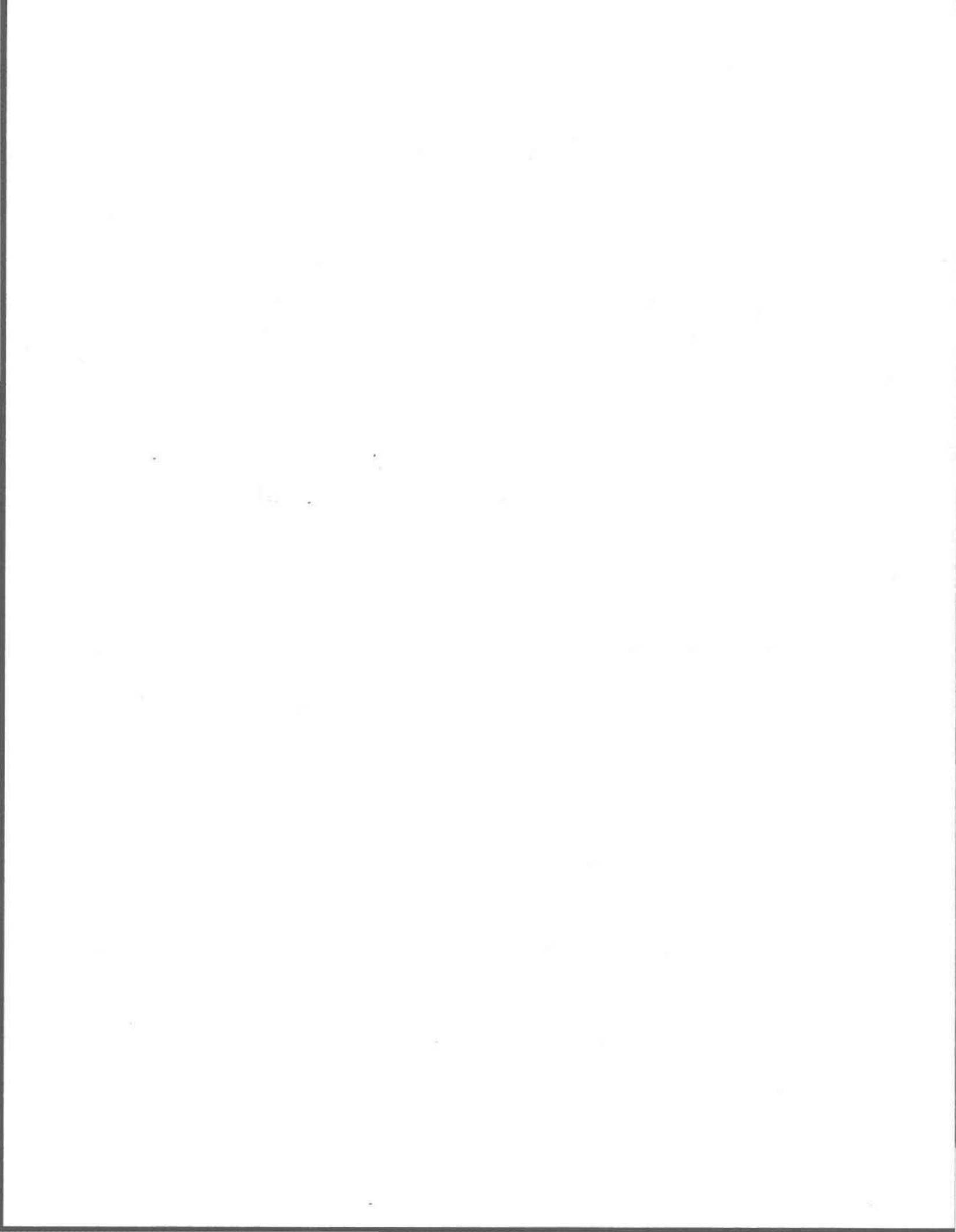


TABLE DE MATIÈRES

Remerciements.....	v
Résumé.....	vii
Liste de tableaux.....	xv
Liste de figures.....	xvii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Problématique	1
1.2 Revue de littérature.....	4
1.2.1 Généralités sur <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	4
1.2.1.1 Métabolisme	6
1.2.1.2 Génétique.....	6
1.2.1.3 Toxines produites par <i>B. thuringiensis</i>	9
1.2.1.4 Mode d'action.....	10
1.2.2 Influence de la composition du milieu de culture et des conditions de fermentation sur la production du biopesticide <i>B. thuringiensis</i>	11
1.2.2.1 Composition du milieu de culture	11
1.2.2.2 Conditions de fermentation	13
1.2.3 Production commerciale de <i>B. thuringiensis</i>	15
1.2.4 Recherches réalisées pour trouver un milieu de culture économique pour la production de <i>B. thuringiensis</i>	17
1.2.5 Les boues d'épuration.....	19
1.2.5.1 Production de boues d'épuration	22
1.2.6 Disposition finale des boues	23
1.3 Hypothèse	25
1.4 But de la recherche	27
2. MÉTHODOLOGIE	29
2.1 Méthodes générales	29
2.1.1 Préparation de l'inoculum de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1	29
2.1.2 Dénombrement de <i>B. thuringiensis</i> (compte total viable et compte de spores).....	30
2.2 Échantillonnage des boues.....	31
2.2.1 Caractérisation de boues	32
2.3 Traitement des boues	33
2.3.1 Boues complètes sans prétraitement	34

2.3.2	Boues complètes avec prétraitement chimique.....	34
2.3.3	Surnageants des boues	34
2.4	Effet du prétraitement des boues d'épuration sur la production de <i>B. thuringiensis</i>	35
2.5	Influence du pH et de la température.....	35
2.5.1	Expériences avec différents pH d'hydrolyse et différentes températures de fermentation.....	36
2.5.2	pH constant au cours de la fermentation.....	37
2.5.3	Application d'un choc thermique pendant la fermentation	37
2.6	Influence de l'agitation	38
2.7	Influence des sources additionnelles de nutriments.....	39
2.8	Cinétique de croissance de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration.....	40
2.9	Détermination de l'entomotoxicité.....	41
2.9.1	Insecte cible et élevage	41
2.9.2	Préparation de la diète	41
2.9.2.1	Technique de contamination de la surface de la diète artificielle avec <i>B. thuringiensis</i>	42
2.9.2.2	Technique d'incorporation du <i>B. thuringiensis</i> dans la diète	42
2.9.3	Bioessais	43
2.9.4	Développement de l'entomotoxicité au cours de la fermentation	43
2.10	Caractérisation génétique de <i>B. thuringiensis</i> HD-1	44
2.10.1	Description de la polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR).....	44
2.10.2	Procédure pour l'obtention de l'ADN	45
2.10.3	Amplification de l'ADN	46
2.10.4	Analyse de l'ADN amplifié	46
3.	CARACTÉRISATION DU MILIEU DE CULTURE ALTERNATIF POUR <i>B. thuringiensis</i>	49
3.1	Caractéristiques des boues utilisées.....	49
3.1.1	Caractéristiques physiques.....	49
3.1.2	Caractéristiques chimiques	52
3.2	Discussion.....	58
4.	UTILISATION DE BOUES D'ÉPURATION COMME MILIEU DE CULTURE.....	61
4.1	Résultats.....	61
4.1.1	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration de différents types et origines.....	61
4.1.2	Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration.....	77
4.2	Discussion.....	81
5.	INFLUENCE DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE <i>B. thuringiensis</i>	89
5.1	Variation de la température et du pH d'hydrolyse.....	90
5.1.1	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	91
5.1.2	Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux	100
5.2	Influence du contrôle du pH pendant la fermentation	104
5.2.1	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	104

5.2.2 Détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux	107
5.3 Application d'un choc thermique pendant la fermentation de <i>B. thuringiensis</i>	112
5.3.1 Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	113
5.3.2 Détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux	116
5.4 Discussion.....	117
6. INFLUENCE DE L'AGITATION SUR LA PRODUCTION DE <i>B. thuringiensis</i> DANS LES BOUES D'ÉPURATION	123
6.1 Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	124
6.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux	128
6.3 Discussion.....	132
7. INFLUENCE DES SOURCES ADDITIONNELLES DE NUTRIMENTS DANS LA PRODUCTION DE <i>B. thuringiensis</i>	137
7.1 Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	137
7.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux	144
7.3 Discussion.....	148
8. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE <i>B. thuringiensis</i> HD-1.....	153
8.1 Préparation des échantillons	154
8.2 Amplification de l'ADN	154
8.3 Résultats.....	157
8.3.1 Échantillons amplifiés	157
8.3.2 Identification des gènes CryIA dans les cultures de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-1 obtenues à partir des boues d'épuration.....	157
8.4 Discussion.....	162
9. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	165
10. BIBLIOGRAPHIE.....	171
11. ANNEXES.....	185

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1.1	Les δ -endotoxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Lereclus <i>et al.</i> , 1993).....	8
Tableau 1.2	Caractéristiques typiques des boues primaires, secondaires et digérées (adapté de Qasim, 1982).....	21
Tableau 1.3	Teneurs moyennes des éléments contenus dans les boues de stations d'épuration municipales du Québec (en mg/kg de matière sèche (Gouv. du Québec, 1991).....	22
Tableau 2.1	Boues des usines d'épuration employées comme milieu de culture pour <i>B. thuringiensis</i>	32
Tableau 2.2	Conditions d'amplification de l'ADN.....	46
Tableau 3.1	Concentration de solides des boues d'épuration.....	50
Tableau 3.2	pH originaux des boues d'épuration	51
Tableau 3.3	Caractéristiques chimiques des boues d'épuration	52
Tableau 3.4	Caractéristiques chimiques en mg/kg de boue sèche des boues d'épuration	55
Tableau 3.5	Contenu (mg/kg de boue sèche) en métaux des boues d'épuration	57
Tableau 4.1	pH final dans les boues d'épuration après la fermentation de Bt.....	63
Tableau 4.2	Croissance de Bt (compte total viable, UFC/mL) dans les boues d'épuration.....	72
Tableau 4.3	Sporulation (nombre de spores viables) de Bt dans les boues d'épuration.....	75
Tableau 4.4	Cinétique de croissance de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration sous les différents traitements.....	77
Tableau 4.5	Potentiel entomotoxique des préparations de Bt obtenues à partir de boues d'épuration	79
Tableau 4.6	Indice d'activité relative des préparations de Bt obtenues à partir de boues d'épuration	81
Tableau 5.1	Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.....	95
Tableau 5.2	Cinétique de croissance de Bt dans la boue de Jonquière à différents pH d'hydrolyse et températures de fermentation.....	99
Tableau 5.3	Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux de Bt.....	102
Tableau 5.4	Influence du contrôle de pH pendant la fermentation de Bt dans la boue de Jonquière	105
Tableau 5.5	Influence du contrôle de pH sur le potentiel entomotoxique produit par Bt dans la boue de Jonquière.....	112
Tableau 5.6	Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.....	115

Tableau 5.7	Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par Bt dans la boue de Jonquière.....	117
Tableau 6.1	Influence de l'agitation sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.....	128
Tableau 6.2	Influence de l'agitation sur le potentiel entomotoxique de Bt.....	130
Tableau 7.1	Influence de l'addition de glucose sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Black Lake (BLS).....	142
Tableau 7.2	Influence de l'addition de glucose et d'extrait de levure (40 mg/L) sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Black Lake (BLS).....	142
Tableau 7.3	Influence de l'addition de glucose sur le potentiel entomotoxique de Bt	146
Tableau 7.4	Influence de l'addition de glucose et d'extrait de levure sur le potentiel entomotoxique de Bt.....	147
Tableau 8.1	Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des gènes CryIA	156
Tableau 8.2	Résultats des amplifications dans les boues sans prétraitement	158
Tableau 8.3	Résultats des amplifications dans les boues avec prétraitement	159

LISTE DE FIGURES

Figure 4.1 A à D	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration sous différents traitements.....	67
Figure 4.1 E à H	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration sous différents traitements.....	68
Figure 4.1 I à L	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration sous différents traitements.....	69
Figure 4.1 M à N	Croissance et sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues d'épuration sous différents traitements.....	70
Figure 5.1	Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la production de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues épuration.....	96
Figure 5.1	Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la production de <i>B. thuringiensis</i> dans les boues épuration.....	97
Figure 5.2	Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur l'indice d'activité relative de sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.....	103
Figure 5.3	Influence du contrôle de pH sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.....	106
Figure 5.4	Influence du contrôle de pH sur la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.....	107
Figure 5.5	Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquière sans solution tampon	109
Figure 5.6	Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquière contenant le tampon PBS	110
Figure 5.7	Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquière contenant le tampon TRIS	111
Figure 5.8	Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.....	114
Figure 5.9	Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.....	115
Figure 6.1	Influence de l'agitation sur la croissance et la sporulation de <i>B. thuringiensis</i> dans la boue de Jonquière.....	127
Figure 6.2	Influence de l'agitation sur l'indice d'activité relative	132
Figure 7.1	Influence de l'addition de nutriments sur la croissance et la sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	143
Figure 7.2	Influence de l'addition de nutriments sur l'indice d'activité relative.....	148
Figure 8.1	Représentation schématique des gènes CryIA et position des amorces utilisés	155
Figure 8.2	Produits d'amplification de la boue de Beauceville avec prétraitement	161



1. INTRODUCTION

1.1 Problématique

La croissance de la population mondiale, associée avec le besoin d'augmenter la production des produits alimentaires et d'améliorer la qualité de vie des citoyens, a causé de considérables altérations dans l'environnement. À ce propos, la conservation des écosystèmes dépend d'un effort de tous les secteurs de la société, y inclus ceux qui sont reliés à l'industrie, l'agriculture, les mines et le traitement de rejets.

Dans le secteur agricole et forestier, les principaux facteurs responsables de la détérioration de l'environnement sont la déforestation, une mauvaise gestion des sols et la pollution occasionnée par l'utilisation des produits chimiques, en particulier des insecticides chimiques (Capalbo, 1995). Ces produits sont employés pour contrôler les insectes nuisibles qui affectent l'agriculture, la foresterie ou qui sont un moyen de transmission de maladies (Ejiofor, 1991), mais leur utilisation présente des problèmes de toxicité vis-à-vis l'environnement (Ejiofor, 1991; Carlton, 1990).

Par exemple, ces insecticides ne sont pas sélectifs ce qui représente un danger pour tout autre organisme qui entre en contact avec ce type de substances (Fischer, 1993; Carlton, 1990). En plus, certaines lignées d'insectes résistants envers ce type de produits ont été sélectionnées, ce qui annule ou limite considérablement l'efficacité de ce type de traitement (Abdel-Hameed, 1992; Fisher, 1993). Ainsi, environ 500 espèces d'insectes ont démontré de la résistance envers les insecticides chimiques (Georghiou et Lagunes, 1988). De plus ces substances ne sont pas biodégradables, elles peuvent s'accumuler dans l'environnement et contaminer les eaux de surface ou souterraines, les sols et les produits alimentaires et ainsi entrer dans la chaîne alimentaire et arriver jusqu'à l'homme (Carlton, 1990).

La prise de conscience de la population envers les dangers que les insecticides chimiques représentent pour l'environnement a restreint leur utilisation dans certains pays et a stimulé la recherche pour développer des moyens alternatifs moins dangereux pour combattre les insectes nuisibles. À ce propos, l'utilisation de microorganismes entomopathogènes tels que les bactéries, les virus, les protozoaires et les champignons (Aronson *et al.*, 1986; Burges, 1986; Daoust, 1990) comme agents biologiques pour le contrôle des insectes nuisibles fait l'objet de recherches intensives surtout depuis les années soixante (Ejiofor, 1991).

Parmi ces agents biologiques, *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) est principalement utilisé pour le contrôle de certains insectes qui sont vecteurs de maladies tropicales ou qui sont nuisibles en agriculture ou en foresterie. Cette bactérie a la capacité de produire pendant sa sporulation, des inclusions cristallines formées de séquences protéiques (les δ -endotoxines) qui ont une activité entomotoxique très spécifique envers les larves de différents insectes nuisibles. La spécificité et la biodégradabilité des cristaux les rendent inoffensifs pour les insectes non cibles, les autres organismes et l'homme (Burges, 1986; Mettus et Macaluso, 1990; de Barjac, 1987) ce qui favorise l'utilisation de ce bioinsecticide par rapport aux insecticides chimiques.

L'utilisation de *B. thuringiensis* est de plus en plus répandue dans le monde en raison des avantages mentionnés, mais dans quelques pays sa production est limitée surtout à cause de coûts du milieu de culture (Dharmsthiti *et al.*, 1985; Ejiofor, 1991). La recherche pour trouver un milieu de culture moins cher capable de soutenir la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis* est faite dans plusieurs pays. L'emploi de sous-produits industriels comme milieux de culture a été envisagé, parmi eux citons la noix de coco (Chilcott et Pillai, 1985; Lee et Seleena, 1991), le sous-produit des usines de production du glutamate de monosodium (Dharmsthiti *et al.*, 1985), de la levure de bière usée (Ejiofor, 1991) et du petit lait (Salama *et al.*, 1983a). Toutefois certaines limitations comme leur disponibilité (Chilcott et Pillai, 1985) ou leur

prétraitement entravent leur utilisation (Ejiofor et Okafor, 1989; Chilcott et Pillai, 1985; Mummigatti et Raghunathan, 1990).

L'utilisation des biopesticides au lieu de pesticides chimiques répond à une partie des exigences des citoyens qui désirent de plus en plus un environnement de qualité (Couillard, 1983) et demandent aux autorités de régler les différents problèmes de pollution. Les gouvernements ont créé des programmes qui visent à l'amélioration des conditions de vie et de l'environnement et pour attaquer spécifiquement les problèmes causés par la pollution de l'eau ils ont mis sur pied des programmes d'assainissement des eaux usées (Crowley *et al.*, 1986). Toutefois si cette option est bien estimée, elle présente une contrepartie, soit la production des boues d'épuration. Ces boues peuvent être considérées comme des déchets, mais elles peuvent être considérées aussi comme une matière potentiellement utilisable et en conséquence recyclable. Bien que la valorisation des boues ne soit pas une pratique nouvelle, leur utilisation pour l'obtention d'un biopesticide n'a pas été encore testée. La présente étude vise donc à la valorisation des boues d'épuration en les utilisant comme milieu alternatif de culture pour l'obtention du biopesticide *B. thuringiensis*. À ce propos, des expériences à l'échelle du laboratoire ont été réalisées avec des boues de différentes origines et types afin d'évaluer leur capacité pour soutenir la croissance, la sporulation ainsi que la production de la δ -endotoxine par cette bactérie.

Le présent document est organisé de la façon suivante. La revue de littérature introduit la problématique générale de *B. thuringiensis* et des boues d'épuration, qui conduit aux objectifs de la recherche. La méthodologie générale est décrite dans le deuxième chapitre. Les caractéristiques des boues employées dans les expériences sont décrites dans le chapitre 3. Le chapitre 4 décrit les résultats des fermentations réalisées avec des boues de différents types et origines. Les chapitres 5, 6 et 7 contiennent les résultats des expériences réalisées en utilisant les boues d'épuration sous différentes conditions de fermentation (pH, température, agitation, addition de nutriments). La stabilité des gènes codant pour l'entomotoxicité chez *B. thuringiensis* obtenu à partir des boues d'épuration

est décrite dans le chapitre 8. Finalement, le dernier chapitre contient les conclusions générales de cette étude et les recommandations.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 Généralités sur *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*)

Au début du siècle, la sériculture japonaise a connu un grave problème: durant plusieurs années, une infection appelée la maladie de Sotto attaquait régulièrement les chenilles du ver à soie *Bombyx mori* (*Lepidoptera Bombycidae*). S. Ishiwata a démontré que l'agent pathogène de cette infection était une bactérie qu'il appela *Bacillus sotto*.

Dix ans plus tard, l'Allemand E. Berliner a trouvé une bactérie semblable chez des chenilles de la teigne de la farine infestant des moulins de Thüringen. Il l'appela *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) et c'est sous ce nom qu'elle est connue.

Dix ans après, *B. thuringiensis* est passé d'agent entomopathogène à celui de bioinsecticide, et fut testé en Europe dans le cadre d'un programme expérimental de lutte contre la pyrale de maïs. La première préparation commerciale est apparue en 1938 en France sous le nom de Sporéine. C'est à la fin des années cinquante qu'apparurent d'autres préparations commerciales de *B. thuringiensis* pour lutter contre les larves de lépidoptères.

Un grand tournant est survenu à la fin des années soixante-dix quand le sérotype *B. thuringiensis israelensis*, extrêmement toxique pour les larves de diptères a été isolé en Israël (Goldberg et Margalit, 1977). Quelques années plus tard, le sérotype *B. thuringiensis tenebrionis*, actif contre certains coléoptères a été découvert par des chercheurs allemands (Krieg *et al.*, 1983).

B. thuringiensis est une bactérie aérobie, gram-positive qui, au cours de sa sporulation, produit un ou plusieurs cristaux protéiques appelés δ -endotoxines (Höfte et Whiteley,

1989; Gelernter, 1990; Parenti *et al.*, 1993; Valéro, 1990). L'activité insecticide de ce bacille est reliée à la production de ces cristaux qui contiennent des séquences protéiques actives contre certains insectes nuisibles. Ces endotoxines ont une activité très spécifique contre différents insectes sensibles, mais comme il a été déjà mentionné, elles sont sans danger pour les mammifères, les oiseaux, les autres insectes et l'homme (Aronson *et al.*, 1986; Gelernter, 1990; Keil, 1991).

Les souches de *B. thuringiensis* sont classées en sérotypes et ce, sur la base de leurs antigènes flagellaires, les antigènes H selon la classification développée par de Barjac et Bonnefoi (1962) et de Barjac et Frachon (1990). Par exemple, les souches de *B. thuringiensis* appartenant aux sérotypes *thuringiensis*, *kurstaki* ou *israelensis*, présentent respectivement l'antigène H1, H3a3b et l'antigène H14. À ce jour, au moins 40 sérotypes différents ont été identifiés (Rajnochapel-Messaï, 1993). Les sérotypes le plus utilisés sont:

-*B. thuringiensis* sérotype 3a3b (variété *kurstaki*) qui est spécifiquement pathogène pour les larves de lépidoptères. Ce sérotype est fréquemment utilisé en agriculture et en foresterie pour la protection des plantes, des céréales et des arbres (Valéro, 1990; Lisansky *et al.*, 1993; Navon, 1993).

-*B. thuringiensis* sérotype 14 (variété *israelensis*) découvert en 1977, qui est spécifiquement pathogène pour les larves de quelques diptères, comme les mouches noires et les moustiques (Rowe et Margaritis, 1987). Il est utilisé pour le contrôle de vecteurs de maladies tropicales et pour l'assainissement de certaines régions comme les cours d'eau qui traversent des villages ou des villes.

-*B. thuringiensis* sérotype 8a8b (variété *tenebrionis*), pathogène spécifique pour les larves de quelques coléoptères (Krieg *et al.*, 1983) comme le doryphore de la pomme de terre.

1.2.1.1 Métabolisme

Bacillus thuringiensis est une bactérie chimiohétérotrophe et son métabolisme complexe n'a pas encore été totalement élucidé. Comme d'autres microorganismes, elle peut se développer dans un milieu de culture contenant de l'eau, des sources de carbone et d'azote ainsi que des éléments minéraux et dans des conditions appropriées de pH, de température et d'aération (Lisansky *et al.*, 1993; Dulmage et Rhodes, 1971).

La bactérie métabolise aérobiquement les hydrates de carbone pendant la phase végétative jusqu'à la forme des acides organiques, qui sont finalement oxydés en dioxyde de carbone (Freese and Fujita, 1976) et il a été démontré récemment que les acides aminés sont aussi utilisés pendant cette phase (Rowe, 1990; Sakharova *et al.*, 1985).

Au milieu de la phase logarithmique, les métabolites produits durant la phase précédente, sont utilisés via le cycle des acides tricarboxyliques (CAT) et le cycle du glycooxylate (Rowe et Margaritis, 1987). Pendant cette phase, la production d'exoprotéases augmente; cet événement a été reconnu comme étant relié avec le début de la sporulation (Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Bibilos et Andrews, 1988).

Au cours de la phase de la sporulation, le métabolisme est basé sur l'utilisation du poly- β -hydroxybutyrate et des acides aminés employés comme sources d'énergie pour la maturation des spores et des cristaux et pour la lyse cellulaire (Rowe 1990).

L'assimilation de l'azote par *B. thuringiensis* est plus complexe et elle n'est pas encore connue suffisamment. Il semble que *B. thuringiensis* l'assimile sous la forme d'ammoniaque ou des acides aminés (Aronson *et al.*, 1975; Aronson, 1976; Borris et Aronson, 1969).

1.2.1.2 Génétique

Il a été démontré que la synthèse de la delta-endotoxine chez *B. thuringiensis* est contrôlée par des gènes contenus dans un ou plusieurs plasmides (Gonzalez *et al.*, 1982;

Faust *et al.*, 1983). Cette bactérie peut héberger jusqu'à dix-sept plasmides dont les dimensions varient de 1,4 à 150 MDa (Carlton et Gonzalez, 1985; Aronson *et al.*, 1986). Les gènes de la protéine du cristal sont situés sur un gros plasmide variant de 50 à 225 kpb (Carlton et Gonzalez, 1984; 1985; Gonzalez *et al.*, 1981; 1982). À ce jour, 25 gènes codant chacun pour une delta-endotoxine, ont été séquencés. Ces gènes ont été classés par Höfte et Whiteley (1989) selon les homologies de séquences entre les différentes δ -endotoxines et les spectres d'activités. Ceci a permis de conclure que ces gènes, appelés *cry* constituent cinq familles, composées elles-mêmes de sous-familles. À chacune correspond une famille de delta-endotoxines ou protéines Cry et un pathotype (Rajinchapel-Messaï, 1993). La famille à laquelle un gène appartient dépend de la séquence des acides aminés et de sa toxicité envers les lépidoptères, les diptères ou les coléoptères (Broadwell, 1994) (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 Les δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (Lereclus *et al.*, 1993)

Famille de δ -endotoxine	Poids moléculaire	Gamme d'hôte	Insectes cible
CryIA(a)		Lépidoptères	Bombyx du mûrier, teigne des crucifères, pyrales du maïs, piéride du chou
CryIA(b)	130 à 138	Lépidoptères	Piéride du chou, noctuelle et sphinx du tabac
CryIA(c)		Lépidoptères	Arpenteuse du chou, noctuelle du tabac
CryIB	138	Lépidoptères	Piéride du chou
CryIC	135	Lépidoptères	Noctuelle de la betterave, piéride et noctuelle du chou, noctuelle du coton
CryID,E, F,	130 à 134	Lépidoptères	Sphinx et noctuelle du tabac, noctuelle de la betterave, pyrale du maïs.
CryIIA	71	Lépidoptères/Diptères	<i>Bombyx disparate</i> , noctuelle et sphinx du tabac, <i>Aedes aegypti</i>
CryIIB	71	Lépidoptères	<i>Bombyx disparate</i> , sphinx et noctuelle du tabac, arpenteuse du chou
CryIIC	70	Lépidoptères	Sphinx du tabac, <i>Bombyx disparate</i> , arpenteuse du chou
CryIIIA	73	Coléoptères	Doryphore, chrysomèle du cresson
CryIIIB	74	Coléoptères	Doryphore
CryIIIC	129	Coléoptères	Doryphore
CryIIID	73	Coléoptères	Doryphore
CryIVA,CryIVB	134 et 128	Diptères	<i>Aedes aegyptii</i> , <i>Culex pipiens</i> , <i>Anophèles stephensi</i>
CryIVC	78	Diptères	<i>Aedes aegypti</i>
CryIVD	72	Diptères	<i>Aedes aegyptii</i> , <i>Culex pipiens</i>
CryVA	81	Lépidoptères/ Coléoptères	Doryphore, pyrale du maïs

1.2.1.3 Toxines produites par *B. thuringiensis*

B. thuringiensis peut synthétiser au moins sept toxines différentes, soit une α -exotoxine (lécithinase C), une exotoxine thermostable (β -exotoxine), le cristal parasporal protéique (δ -endotoxine) et quatre autres toxines moins importantes. Les α -exotoxines et la β -exotoxine s'accumulent pendant la phase de croissance exponentielle de certaines variétés et ne peuvent être employées pour la lutte biologique à cause de leur effet tératogène (Rowe et Margaritis, 1987).

Les δ -endotoxines, qui sont en réalité des protoxines, sont celles qui confèrent son pouvoir entomopathogène et sa spécificité à *B. thuringiensis*. Elles sont synthétisées au moment de la sporulation et s'accumulent en formant des inclusions cristallines parasporales. Les cristaux peuvent représenter jusqu'à 30% du poids sec des spores et une petite quantité de cette endotoxine peut être trouvée dans la paroi des spores (Aronson *et al.*, 1982).

Pendant sa sporulation, *B. thuringiensis* produit une spore et généralement un cristal protéique, mais certaines variétés peuvent produire deux cristaux ou plus. La plupart des variétés produisent des cristaux qui se présentent principalement sous la forme d'une bipyramide avec des striations proéminentes à la surface (Hannay, 1953), mais dans certains variétés les cristaux peuvent être cubiques ou rectangulaires plats. La forme du cristal peut avoir une certaine relation avec son spectre toxique (Lereclus *et al.*, 1993). Ainsi, les cristaux protéiques codés par les gènes *cryI* qui ont la forme bipyramidale sont actifs contre les larves des lépidoptères. Les cristaux protéiques codés par les gènes *cryII* sont pléomorphiques et agissent contre les larves des diptères. Finalement, les cristaux protéiques codés par les gènes *cryIII* sont de forme rectangulaire et plats et ils présentent une action entomopathogène contre les larves des coléoptères (Federici, 1993).

Les cristaux des différentes variétés présentent une grande complexité dans leur composition et dans le nombre de chaînes peptidiques (Fast, 1981; Federici, 1993). Ils peuvent être formés d'un seul type de protéine ou d'un mélange de deux ou trois (Höfte et

Whiteley, 1989; Federici *et al.*, 1990). Les sous-unités des protéines sont des protoxines qui sont converties en fragments toxiques après avoir été ingérées par des larves des insectes susceptibles (Stahly *et al.*, 1992).

La spécificité des cristaux produits par *B. thuringiensis* n'est pas encore très bien comprise. Elle s'explique en fonction de la structure de la protéine du cristal, par des différences dans l'intestin moyen des larves qui peuvent affecter leur solubilisation ou pour la présence de sites spécifiques de liaison (specific toxic-binding sites) dans l'intestin moyen des larves.

1.2.1.4 Mode d'action

Heimpel et Angus ont classé les lépidoptères en raison de leur susceptibilité envers la δ -endotoxine, les spores ou la combinaison des deux. Les lépidoptères du type I sont susceptibles à la δ -endotoxine mais les spores n'exercent aucune influence; ceux du type II sont susceptibles à la δ -endotoxine mais son effet est augmenté par la présence des spores et les lépidoptères du type III sont ceux sur lesquels la combinaison de cristaux et de spores est toxique. Les plus sensibles ont un pH élevé dans leur intestin moyen ce qui permet la dissolution des cristaux et l'activation de la protoxine. La majorité des lépidoptères appartiennent au groupe I et la plupart des études réalisées pour connaître le mode d'action de la δ -endotoxine ont été réalisées avec des chenilles de ce groupe (Burgess, 1982; Burgess *et al.*, 1976; Cooksey, 1971; Heimpel et Angus, 1959).

Le pouvoir pathogène de *B. thuringiensis* survient suite à l'ingestion du complexe spores-cristaux par les larves des insectes. Quelques minutes après l'ingestion, les cristaux parvenus dans l'intestin moyen, se dissolvent et libèrent les toxines ou protoxines qui les composent. Ces dernières, digérées par les protéases, génèrent des fragments toxiques d'environ 620 acides aminés qui se fixent avec une grande affinité sur des récepteurs présents au niveau des microvillosités de l'épithélium (cellules à bordure en brosse). Il se succède alors, une série d'événements comme la déformation des cellules intestinales, la formation de pores transmembranaires et des modifications dans l'équilibre osmotique.

Tous ces événements conduisent à la lyse des cellules. L'une des conséquences de ces événements est l'arrêt de l'alimentation des larves. La destruction de la barrière intestin/hémocoèle provoque alors une réduction du pH et une libération de nutriments. Dans certains cas, ces conditions favorisent la germination des spores et la multiplication de la bactérie. L'intestin étant entièrement détruit, la bactérie envahit toute la cavité interne de l'insecte. À la fin du cycle d'infection, le cadavre est détruit et il y a libération de spores dans l'environnement (Lambert et Peferoen, 1992).

1.2.2 Influence de la composition du milieu de culture et des conditions de fermentation sur la production du biopesticide *B. thuringiensis*

La composition du milieu de culture et les conditions de fermentation peuvent avoir une influence sur le complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis*. Selon Dulmage (1970a) les biopesticides obtenus à partir de cette bactérie ne peuvent pas être standardisés en tenant compte de la quantité de spores produite, car les caractéristiques de chaque milieu de culture et les conditions de la fermentation ont une influence sur la production du complexe spores-cristaux. En plus, l'activité entomotoxique peut varier selon la variété de *B. thuringiensis* et l'insecte cible utilisés. L'influence de ces facteurs est décrite dans les sections suivantes.

1.2.2.1 Composition du milieu de culture

Bien que les besoins physiologiques des variétés de *B. thuringiensis* peuvent varier (Dulmage *et al.*, 1990), cette bactérie peut croître dans différents milieux de culture. Un bon milieu de culture pour une variété peut ne pas donner les mêmes résultats pour une autre variété, ce qui rend difficile l'établissement d'un milieu de culture standard (Singer *et al.*, 1966; Dubois, 1968). Mais dans tous les cas, un milieu de culture doit contenir les éléments adéquats pour permettre une bonne croissance et une bonne sporulation de la bactérie.

B. thuringiensis a la capacité de produire des amylases et des protéases, ce qui le rend capable d'utiliser une grande gamme de substrats (Bernhard et Utz, 1993). Dans la

production industrielle les milieux de culture employés peuvent contenir comme sources de carbone de l'amidon, des mélasses, du dextrose, des farines et du glycérol. La concentration d'hydrates de carbone peut influencer la production de la δ -endotoxine. Scherrer *et al.* (1973) ont trouvé que la dimension, la quantité de protéines et le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux pouvaient varier selon la concentration de glucose utilisée dans le milieu de culture; la même conclusion est obtenue dans les expériences de Yudina *et al.* (1993). Pearson et Ward (1988), en utilisant différentes sources de carbone (du glucose, des mélasses et de l'amidon) et différentes concentrations, ont trouvé que les niveaux d'entomotoxicité ont varié dans les complexes spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* variété *israelensis*. Par contre, des résultats obtenus en travaillant avec la variété *galleriae* dans un milieu de culture contenant du glucose ont montré que des concentrations supérieures à 50 g/L ont un effet négatif sur la croissance et la sporulation de la bactérie (Sakharova *et al.*, 1989). Il est donc très important de déterminer la concentration optimale des sources de carbone de façon à éviter de conditions pouvant inhiber la croissance de la bactérie (Scherrer *et al.*, 1973).

Du côté de la source d'azote, *B. thuringiensis* peut l'assimiler sous la forme d'ammoniaque ou des acides aminés. La littérature concernant le métabolisme du *B. thuringiensis* suggère que l'ammoniaque est la source d'azote employée durant la phase de croissance exponentielle, tandis que les acides aminés sont plutôt utilisés pendant la phase de sporulation (Egorov *et al.*, 1984). L'influence des acides aminés sur la croissance de *B. thuringiensis*, varie selon les souches. L'histidine, la thréonine, la tyrosine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la sérine et la lysine ne supportent pas la croissance de *B. thuringiensis* variété *thuringiensis*, tandis que l'arginine, l'acide aspartique, la glycine, la proline, l'asparagine, la méthionine et la glutamine permettent la croissance de cette bactérie (Rajalakshmi et Shethna, 1977; Singer et Rogoff, 1968). Pour *B. thuringiensis* variété *israelensis*, la leucine et la méthionine ont une influence positive sur sa croissance. Par contre, la valine, l'isoleucine, la serine et la glycine ne donnent pas de bons résultats sur la croissance de cette variété (Abdel-Hameed, 1992). Les milieux commerciaux emploient généralement comme sources d'azote, des graines de maïs, de la

liqueur de maïs trempé, de la farine de poisson, de la farine de soja, de la farine de coton, de la caséine, et des sous-produits de la production de boissons alcoolisées, entre autres. Les milieux sont parfois enrichis avec de l'extrait de levure ou de la peptone (Rowe et Margaritis, 1987). Selon Dulmage (1981), l'omission de ces suppléments, peut affecter la sporulation et en conséquence la production de la δ -endotoxine. Goldberg *et al.* (1980) ont observé que la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* ont augmenté quand l'extrait de levure était additionné au milieu de culture.

La présence de divers ions dans le milieu de culture est nécessaire pour obtenir une bonne croissance et un bon niveau entomotoxique (Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Ejiofor et Okafor, 1989). Le potassium, le calcium, le manganèse et le magnésium peuvent influencer positivement la production de la δ -endotoxine (Arcas *et al.*, 1984; Foda *et al.*, 1985). La présence de certains ions métalliques comme le cuivre, le fer, le cobalt et le zinc dans des concentrations appropriées dans un milieu de culture peut aussi améliorer la croissance et la sporulation de la bactérie (Bernhard et Utz, 1993). Mais il faut mentionner que les concentrations optimales des minéraux peuvent varier pour les différentes variétés de *B. thuringiensis* (Sikdar *et al.*, 1991; Abrosimova *et al.*, 1986). Il est donc important de trouver les concentrations adéquates pour chacune des variétés dans un milieu de culture.

1.2.2.2 Conditions de fermentation

B. thuringiensis est une bactérie aérobie et l'oxygénation des milieux de culture est très importante pour la croissance, la sporulation et la formation de la δ -endotoxine. Une toxicité plus élevée est obtenue dans des cultures de *B. thuringiensis* réalisées sous un bon niveau d'aération (Dulmage *et al.*, 1990). Foda *et al.* (1985) en variant la relation air-milieu de 9:1 à 19:1 ont trouvé que les comptes totaux, les niveaux de sporulation et le potentiel entomotoxique de *B. thuringiensis* variété *entomocidus* étaient plus élevés sous les dernières conditions air-milieu (19:1). Des expériences réalisées avec *B. thuringiensis* variété *israelensis* ont montré que sous des conditions de limitation d'oxygène, la

croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine étaient inférieures à celles obtenues sans limitation d'oxygène (Avignone *et al.*, 1992). L'ensemble des expériences décrites au sujet du comportement de *B. thuringiensis* sous différents niveaux d'oxygénation indiquent qu'il est important de fournir une bonne aération pendant la croissance de la bactérie et que les conditions anaérobies sont à éviter si de bons résultats sur la sporulation et le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux sont à espérer d'une fermentation dans un milieu de culture donné.

Un autre facteur qui peut avoir aussi une influence sur le développement de *B. thuringiensis* est la température. Cette bactérie peut croître à une température variant entre 15 °C et 45 °C; mais des expériences réalisées avec *B. thuringiensis* variété *israelensis* cultivé à 43 °C ont montré que des températures plus élevées que 40 °C peuvent causer la perte des plasmides (Gonzalez et Carlton, 1984), ce qui aura une conséquence sur la production de la δ -endotoxine. Les basses températures (entre 12 °C et 16 °C) pouvant altérer le métabolisme de *B. thuringiensis* (Smirnoff, 1963) ne sont pas recommandables. Abdel-Hameed *et al.* (1991) ont montré l'influence que la température peut avoir sur la production de la δ -endotoxine. Ce groupe de chercheurs ont cultivé *B. thuringiensis* H-14 sous différentes températures et ils ont trouvé que la production de la δ -endotoxine est réduite de 90% et 45% par rapport à celle obtenue à 30 °C, quand les fermentations ont été réalisées à 28 °C et 33 °C, respectivement. Donc il est important de réaliser la culture de cette bactérie dans les conditions de température optimale que se trouvent généralement entre 26°C et 30°C (Bernhard et Utz, 1993).

Pendant la croissance de *B. thuringiensis*, les produits métaboliques peuvent modifier le pH du milieu de culture. Ainsi, l'utilisation de sources de carbone peut donner lieu à la production d'acides, ce qui fait diminuer le pH dans le milieu de neutre à 5.8 ou 6 (Taborsky, 1992). Pendant la phase de sporulation, le métabolisme de cette bactérie est basé surtout sur l'utilisation d'acides aminés provenant de la lyse cellulaire et des protéines du milieu de culture (Rowe et Margaritis, 1987); pendant cette phase le pH peut monter à 8 ou 8.5 (Taborsky, 1992). Si ces changements dans le pH du milieu ne sont pas

contrôlés, la croissance de la bactérie et la production de la δ -endotoxine peuvent être diminuées (Sikdar *et al.*, 1991; Taborsky, 1992; Abdel-Hameed *et al.*, 1991). Par exemple, la production de cette endotoxine par *B. thuringiensis* H-14 est réduite à 82% et 80% par rapport aux niveaux trouvés quand un contrôle du pH près de la neutralité a été effectué dans le milieu de culture employé (Abdel-Hameed *et al.*, 1991). L'échelle recommandé du pH pour la croissance de *B. thuringiensis* se trouve entre 6.5 et 7.5 et afin de maintenir ce pH pendant les fermentations, le contrôle peut être effectué par l'addition de solutions tampon ou par l'addition d'acide/base dans le milieu de culture (Dulmage et Rhodes, 1971).

1.2.3 Production commerciale de *B. thuringiensis*

La production commerciale de *B. thuringiensis* a débuté dans les années cinquante, mais c'est la découverte de *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 dans les années 70 qui en a fait un véritable succès commercial (Lisansky *et al.*, 1993; Rowe et Margaritis, 1987; Daoust, 1990). La production commerciale et l'utilisation plus répandue dans le monde de *B. thuringiensis* a commencé vers le début des années 80. Le marché était dominé par des produits à base de *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 utilisé pour le contrôle des larves de lépidoptères en agriculture et foresterie. Le plus grand marché était celui du contrôle des insectes ravageurs des forêts en Amérique du Nord, où *B. thuringiensis* commençait à remplacer les insecticides chimiques; son utilisation représentait environ 60% des ventes mondiales au milieu des années 80 (Burgess et Daoust, 1986). En 1989, les grandes entreprises internationales avaient déjà mis sur le marché plus de 50 produits différents à base de *B. thuringiensis*. Les marques telles Dipel, Thuricide, Futura et Foray étaient toutes des suspensions contenant *B. thuringiensis* variété *kurstaki*. Des nouveaux marchés ont été ouverts après la découverte de la variété *israelensis* (Goldberg et Margalit, 1977), après laquelle a commencé la commercialisation des produits pour le contrôle de moustiques et de mouches noires.

À l'échelle mondiale, en 1990, 60% des ventes du *B. thuringiensis* ont été utilisées pour contrôler les insectes nuisibles en agriculture; 20% ont été utilisées en foresterie et le 20%

restant a été utilisé en Amérique du Nord et en Afrique de l'Ouest pour contrôler les insectes vecteurs de maladies tropicales (van Frankenhuyzen, 1993; Akpoboua *et al.*, 1989). En 1992, les ventes mondiales représentaient entre 45-60 millions \$US. Aujourd'hui *B. thuringiensis* est le bioinsecticide le plus utilisé et représente entre 80-90% du marché des agents biologiques dans le monde (Bernhard et Utz, 1993). En l'an 2000, les ventes prévues pourraient s'élever à 300 millions \$US (McKenny, 1990). Au Canada, la superficie traitée par ce bioinsecticide pour protéger les forêts contre les lépidoptères nuisibles, en particulier la tordeuse des bourgeons de l'épinette, a augmenté de moins de 5% du total de l'aire arrosée au début des années 80 à plus de 60% à la fin de cette décennie (van Frankenhuyzen, 1993).

L'entrée du *B. thuringiensis* dans le marché des insecticides a été lente mais plusieurs facteurs devraient en influencer favorablement une plus grande consommation. Parmi ceux-ci, il est possible de citer qu'il ne pose pas des dangers pour les organismes non cibles en comparaison avec les insecticides chimiques. Par exemple, tous les tests de sécurité réalisés dans le monde entier depuis plus de 25 ans avec *B. thuringiensis* variété *kurstaki* ont révélé qu'il est spécifiquement pathogène pour les larves de lépidoptères et qu'il n'a aucun effet sur les autres organismes (Burgess et Hussey, 1971). En plus il est biodégradable, donc il ne s'accumule pas dans l'environnement et les produits alimentaires traités avec ce bioinsecticide sont donc sans danger vis-à-vis la santé des humains ou des animaux (Gelernter, 1990).

La production de *B. thuringiensis* dépend de divers facteurs. Les principaux sont les coûts de production qui dépendent eux-mêmes surtout des conditions de fermentation utilisées et des coûts du milieu de culture (Ejiofor, 1991). La sélection du milieu de culture est un facteur critique pour la production commerciale de ce biopesticide parce qu'à mesure que le volume de production augmente, les coûts du milieu constituent une grande proportion du coût total et peuvent devenir le facteur limitant selon les volumes de production. Ainsi, pour une usine qui produit 20 tonnes de ce bioinsecticide par année, produire un kilo coûte environ 14.68 \$US, tandis que pour une production de 200 tonnes par année, le

coût serait de 5.09 \$US. Dans le premier cas le coût du milieu de culture représente environ 7.4% du coût total et l'investissement pour la construction de l'usine et l'équipement est de 33.7% par rapport au total. Par contre, dans le cas des usines qui produisent 200 tonnes par année, l'investissement pour la construction et l'équipement est réduit à 18.51% du coût total, tandis que le coût du milieu de culture représente 29.6% du coût total par kilo (Lisansky *et al.*, 1993).

Bien que les bioinsecticides à base de *B. thuringiensis* aient des avantages par rapport aux insecticides chimiques, leur utilisation est restreinte pour des raisons économiques (Dulmage, 1981), surtout dans les pays où le coût du milieu de culture limite la production. L'utilisation des matériaux moins chers comme éléments nutritifs dans le milieu de culture a déjà été envisagée et cela constitue probablement l'alternative la plus valable pour réduire les coûts de production et pour encourager sa commercialisation (Ejiofor, 1991; Mummigatti et Raghunathan, 1990; Salama et Morris, 1993).

1.2.4 Recherches réalisées pour trouver un milieu de culture économique pour la production de *B. thuringiensis*

Il a été déjà mentionné que dans la production commerciale de *B. thuringiensis*, les principales sources d'azote employées sont la farine de soja, la levure de bière et la farine de poisson, tandis que le glucose, le sucrose, les mélasses et l'amidon sont employés comme sources de carbone. Les milieux de culture sont enrichis avec de l'extrait de levure et des sels de potassium, du calcium, du manganèse, du zinc et du fer qui constituent des facteurs importants pour la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine chez cette bactérie (Lisansky *et al.*, 1993; Bernhard et Utz, 1993; Black et Snyman, 1991).

À cause des coûts de production, l'usage de *B. thuringiensis* est limité dans certains pays comparativement à l'emploi des insecticides chimiques. La recherche pour trouver un milieu de culture pouvant réduire les coûts de production et capable de soutenir la croissance de la bactérie est réalisée partout le monde. C'est pourquoi, des sous-produits

agricoles comme le petit lait, la liqueur de maïs trempé, la farine de coton, le son de blé, les extraits de pomme de terre, des carottes, la fécule de cassave, la levure de fourrage, la fève de lima, l'écorce de citron et la farine de dattes ont été employés comme additifs aux milieux contenant du glucose, de l'extrait de levure et des grains de légumineuses (arachides, pois, fèves de lima, haricots de Soissons, grains de soja) afin d'évaluer leur performance pour soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* (Ejiofor, 1991; Salama *et al.*, 1983a,b,c; Mummigatti et Raghunathan, 1990; Obeta et Okafor 1984; Ejiofor et Okafor, 1989, 1991).

D'autres sous-produits ont aussi été testés, en particulier l'endosperme de noix de coco (Chilcott et Pillai, 1985), un sous-produit de la production du glutamate de monosodium (Dharmsthiti *et al.*, 1985), du sang de vaches ajouté à quelques sels minéraux et des grains de légumineuses (Obeta et Okafor, 1984). La farine de certaines légumineuses ou de soja mélangée avec de l'amidon ou des mélasses a aussi été évaluée pour la production de ce bioinsecticide (Mummigatti et Raghunathan, 1990; Abdel-Hameed *et al.*, 1991). L'Annexe A montre les différents sous-produits et les variétés de *B. thuringiensis* utilisés, ainsi que l'efficacité biologique des produits obtenus.

Il est évident que les recherches réalisées jusqu'à présent ont concentré les efforts surtout dans la réutilisation de sous-produits industriels ou agroalimentaires qui sont des substrats économiques et localement disponibles. Certains des sous-produits cités sont utilisés avec succès en fermentation industrielle dans plusieurs pays (Mummigatti et Raghunathan, 1990). En cherchant un milieu alternatif de culture pour soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis*, il doit être moins cher que les milieux de culture employés actuellement et disponible en quantité suffisante dans l'endroit où il va être utilisé. Il existe un "substrat" qui n'a pas été encore testé. Il n'est pas cher. Il est produit en abondance et il contient des éléments pouvant soutenir la croissance de cette bactérie: il s'agit des boues d'épuration. Son utilisation comme milieu de culture pour la production de *B. thuringiensis* pourrait aider à résoudre deux des problèmes qui affectent l'environnement: premièrement, en augmentant la production et

la commercialisation de *B. thuringiensis*, pour diminuer l'utilisation des insecticides chimiques et deuxièmement, réutiliser les boues d'épuration d'une nouvelle façon.

1.2.5 Les boues d'épuration

Les eaux usées provenant des villes ou de l'industrie contiennent des polluants de différents types qui vont se trouver en suspension, sous forme de colloïdes ou dissous, pouvant être d'origine organique ou inorganique. Comme matière organique, les polluants sont des protéines, des hydrates de carbone, des gras, des huiles et des matières synthétiques (agents tensioactifs, phénols ou pesticides). Les polluants d'origine inorganique sont les chlorures, les sels minéraux (de calcium, de magnésium et de potassium), le phosphore, l'azote, le soufre, des ions métalliques (le cuivre, le cadmium, le plomb, le chrome, le manganèse, le nickel, le fer, le mercure et le zinc). Il y a aussi des polluants d'origine biologique. Ce sont les microorganismes tels que les bactéries, les protozoaires, les virus et les parasites. Le traitement d'une eau usée a pour but d'enlever ces polluants et il est réalisé à l'aide de processus physiques, chimiques et biologiques. Les processus physiques ont pour but d'enlever, par l'application de forces physiques, les matières facilement sédimentables ou en flottation. Ils comprennent la sédimentation, la flottation, la floculation et la filtration. Dans les processus chimiques l'élimination des polluants est réalisée par l'ajout de produits chimiques; la précipitation, la transmission de gaz, l'adsorption et la désinfection sont inclus dans ce groupe. Avec les processus biologiques, l'élimination des polluants organiques facilement biodégradables (matière colloïdale et dissoute) est accomplie à l'aide de microorganismes qui les utilisent comme substrats pour leur métabolisme. Les trois types de processus peuvent être regroupés dans des chaînes de traitement qui, selon le genre de processus duquel il est formé, peuvent être appelées primaire (processus physiques), secondaire (combinaison des processus chimiques et biologiques) ou tertiaire (combinaison des trois). Ces termes sont plutôt arbitraires parce que le plus important, c'est de connaître le niveau d'élimination des polluants requis et de décider en fonction les types de processus à employer dans la chaîne de traitement (Metcalf et Eddy, 1972). Donc le traitement des eaux usées permet

d'obtenir une eau de qualité acceptable pour le rejet dans l'environnement, mais en même temps, il produit un autre effluent: les boues d'épuration.

Les boues d'épuration sont des suspensions complexes formées d'eau (entre 95% à 98%), de matière organique et inorganique de différentes tailles ainsi que d'une population microbienne très variée. Le volume et les caractéristiques des boues varient selon l'origine (municipal ou industriel) et le type de traitement donné à l'eau résiduaire. En conséquence elles contiennent les polluants enlevés aux eaux ainsi que des produits du métabolisme de la population microbienne présente en elles et ceux dus au processus du traitement. Selon l'étape du traitement d'où elles proviennent, les boues d'épuration sont d'origine primaire, secondaire ou digéré.

Les boues primaires sont obtenues principalement du décanteur primaire et les solides qu'elles contiennent sont d'origine minérale et organique. Le pourcentage de matières sèches n'excède généralement pas 5% (Roques, 1979). Les boues secondaires qui proviennent du bassin d'aération et du clarificateur secondaire présentent une nature organique puisqu'elles sont formées de floccs bactériens constitués d'un ensemble de microorganismes vivants ou morts, de particules organiques, de colloïdes organiques et de débris de cellules lysées. Entre 70 à 80 % de leur contenu en matière en suspension correspondent aux matières volatiles en suspension (MVES) (Roques, 1979). Avant de réaliser le conditionnement nécessaire pour leur élimination finale, les boues primaires et secondaires doivent être stabilisées afin de réduire leur contenu en matière organique, en pathogènes et leurs odeurs désagréables, ce qui conduit aux boues digérées. Leur stabilisation est réalisée en utilisant des moyens chimiques, thermiques ou biologiques (digestion aérobie ou anaérobie) (Metcalf et Eddy, 1972; Qasim, 1982). Le Tableau 1.2 montre les caractéristiques typiques des boues primaires, secondaires et digérées et le Tableau 1.3 les caractéristiques des boues des stations d'épuration municipales du Québec.

Tableau 1.2 Caractéristiques typiques des boues primaires, secondaires et digérées
(adapté de Qasim, 1982)

Composant	Boue primaire	Boue secondaire (boue activée)	Boue digérée
pH	5.0-6.5	6.7-7.5	6.5-7.5
Solides totaux (%, base sèche)	3-8	0.5-1.0	5.0-10.0
Matière volatile (%, base sèche)	60-80	60-90	30-60
Protéine (%, base sèche)	20-30	32-41	15-20
Azote (%, base sèche)	1.5-4.0	2.5-7.0	1.6-6.0
Phosphore (%, base sèche)	0.8-2.8	2.0-7.0	1.4-4.0
Cadmium (mg/kg)	16	-	76
Chrome (mg/kg)	110	-	160
Cuivre (mg/kg)	200	-	340
Plomb (mg/kg)	500	-	-
Zinc (mg/kg)	620	-	930

Tableau 1.3 Teneurs moyennes des éléments contenus dans les boues de stations d'épuration municipales du Québec (en mg/kg de matière sèche) (Gouv. du Québec, 1991)

Composant	Teneur
C org. Tot	315 000
N total (NTK)	51 741
N-NH ₄	12 035
N-NO ₃ + NO ₂	300
P total	12 025
K	5 032
Ca	12 572
Mg	4 044
Al	11 000
As	2,7
B	71
Ba	400
Cd	3,2
Co	17,3
Cr	44,5
Cu	699
Fe	18 000
Hg	1,6
Mn	1 113
Mo	11,3
Ni	20,8
Pb	98
Se	0,6
Zn	595
BPC	<0,5

1.2.5.1 Production de boues d'épuration

Comme il a été expliqué, les différents processus employés dans une chaîne de traitement des eaux usées (physiques, chimiques ou biologiques) génèrent des boues provenant de la séparation solide-liquide. La quantité de boue produite varie selon le type de traitement, le volume à traiter et l'origine de l'eau (municipal ou industriel). Selon les chiffres

estimés, chaque personne peut produire par jour entre 50 à 100 grammes de boue sèche (Vergès, 1984; Environnement Canada, 1985; Webber, 1984; Sabey et Hart, 1975). Au Québec le gouvernement a mis sur pied un programme d'assainissement des eaux usées qui a été commencé en 1978 et échelonné sur une dizaine d'années. Le programme a visé 900 municipalités de toutes les régions du Québec (Couillard *et al.*, 1986), ce qui représente 5,2 millions de personnes (Giroux, 1986). Sur cette base, entre 100 000 à 200 000 tonnes de boues sont produites par année dans la province (Grenier et Couillard, 1989). Au Canada, en 1981 environ 48% de la population bénéficiait de stations d'épurations, mais depuis cette année la construction d'usines d'épuration a augmenté considérablement. Dans sept provinces canadiennes, toutes les eaux usées conduites par des égouts municipaux sont déjà traitées avant leur disposition finale (Webber, 1988). En raison de la croissance dans la construction d'usines d'épuration dans les provinces restantes, la quantité de boues va augmenter. On estime que la production de boues pourrait atteindre 1 million de tonnes de matière sèche à la fin du siècle (Tyagi *et al.*, 1993). Aux États Unis la production annuelle de boues a atteint 5.4 millions de tonnes de boues sèches (USEPA, 1993) et avec les programmes d'assainissement prévus pour l'année 2010, la quantité de population desservie sera de 87% ce qui fera augmenter considérablement la quantité de boues produites (Burton Environmental Engineering *et al.*, 1993). En Europe, parmi les pays qui forment la communauté européenne (CEE) une augmentation de 33% de la quantité de boues a été notée de 1984 à 1994 (Olivier, 1994) et elle va augmenter au cours des années.

1.2.6 Élimination finale des boues

Le traitement des eaux usées est une pratique encouragée de plus en plus dans le monde afin de diminuer les impacts négatifs du rejet de polluants; mais en même temps l'élimination finale des boues qui sont générées doit se faire en respectant l'environnement. Le traitement des boues (épaississement, conditionnement et déshydratation) et leur élimination peuvent représenter environ 50% du coût d'opération d'une usine de traitement (Lester *et al.*, 1983; Pahren, 1980; Vesilind, 1980). Il est donc

important de trouver des solutions économiques pour affronter l'élimination finale de la quantité de boues générées. Les principaux procédés employés actuellement sont le rejet en mer, l'incinération, l'enfouissement et le recyclage.

Le rejet en mer était amplement utilisé par les villes côtières, mais les problèmes environnementaux qu'il occasionne (contamination des sédiments et des espèces marines) constituent un facteur important qui a obligé les gouvernements à en diminuer la pratique (Bruce et Davis, 1989). Cela est de moins en moins employé (Couillard et Mercier, 1994; Lester *et al.*, 1983). Ce mode d'élimination n'est pas utilisé au Québec (Grenier et Veilleux, 1991). Il est interdit aux États-Unis depuis quelques années et il sera aboli en Europe en 1998 (Bradley *et al.*, 1992).

L'incinération peut offrir certains avantages par rapport aux autres moyens d'élimination, comme la réduction à environ 20% du volume que constituent les solides des boues. Elle élimine aussi quelques problèmes environnementaux potentiels comme la présence de microorganismes pathogènes et des substances organiques toxiques; mais c'est un procédé coûteux par la quantité d'énergie dont il a besoin. Elle entraîne d'autres problèmes comme la contamination de l'air par l'émission possible de mercure et de cadmium lors de la combustion et l'élimination par enfouissement des cendres générées (Tyagi et Couillard, 1989).

L'enfouissement sanitaire dans des endroits contrôlés constitue une des techniques amplement utilisées. Aux États-Unis, 20% de boues sont ainsi disposées tandis qu'en Europe le pourcentage augmente à 40% (USEPA, 1990). Mais même s'il est très utilisé, les coûts liés à l'enfouissement et la difficulté d'identifier les sites adéquats, le rendra plus difficile dans le futur (Mercier, 1988).

La valorisation des boues en agriculture et en foresterie permettant de tirer profit de leur valeur comme fertilisants (Mostaghimi *et al.*, 1992; MENVIQ et MAPAQ, 1991; Couillard et Grenier, 1987), constitue une des techniques envisagées dans le cadre du

recyclage des boues. La valeur des boues d'épuration comme fertilisants et agents d'amendement des sols est mondialement reconnue en raison de leur contenu en éléments nutritifs importants comme l'azote, le phosphore (MENVIQ et MAPAQ, 1991) et la matière organique. En effet, elles peuvent contenir de 3 à 5 % d'azote, de 1 à 4 % de phosphore sur une base de matière sèche (Wong et Henry, 1984) et 30 % de carbone organique sur une base sèche (Couillard et Grenier, 1989). L'épandage et la disposition en surface constituent les pratiques les plus employées aux États-Unis où 40% de la production annuelle de boues sont gérés de cette façon (USEPA, 1993). En Europe, plus de 40% de la production annuelle de boues sont valorisées en agriculture (Blais *et al.*, 1993; Olivier, 1994). Le recyclage est une pratique plus économique et plus écologique que les autres modes de disposition finale (Baldwin *et al.*, 1983; Sabey et Hart, 1975) et il permettrait de récupérer une partie des frais liés à l'élimination des boues (Grenier et Veilleux, 1991). Dans le cadre du développement durable, le Gouvernement du Québec (Gouvernement du Québec, 1983), celui du Canada (Environnement Canada, 1985) et l'agence américaine de protection de l'environnement (USEPA, 1979) favorisent le recyclage comme pratique de disposition finale des boues.

D'autres options pour recycler les boues d'épuration ont été envisagées (préparation de peinture, de papier, conversion en carburants, entre autres) (Bowen *et al.*, 1989; Harper *et al.*, 1988), mais la quantité de boues produites par les usines d'épuration ne cesse d'augmenter. Tout en respectant l'environnement, il est souhaitable de trouver d'autres alternatives pour réaliser leur disposition finale. La recherche dans ce domaine doit donc viser à l'identification de solutions tirant profit de la valeur intrinsèque de ces résidus.

1.3 Hypothèse

B. thuringiensis représente une alternative favorable à l'utilisation des insecticides chimiques et l'intérêt pour trouver un milieu de culture alternatif plus économique pour sa production, a encouragé la recherche surtout du côté de l'utilisation des sous-produits agroindustriels (Ejiofor, 1991; Salama *et al.*, 1983 a,b,c; Mummigati et Raghunathan, 1990; Obeta et Okafor, 1984; Ejiofor et Okafor, 1989; Chilcott et Pillai, 1985;

Dharmsthiti *et al.*, 1985). Mais les sous-produits testés présentent certains problèmes dans leur usage. La plupart d'entre eux ont besoin d'un prétraitement compliqué avant de pouvoir être employés (Ejiofor et Okafor, 1989; Chilcott et Pillai, 1985; Mummigatti et Raghunathan, 1990). D'autres requièrent l'addition d'éléments pour soutenir la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* (Salama *et al.*, 1983 a,b,c). En plus, dans quelques cas, leur disponibilité est limitée ou restreinte à l'endroit où les expériences ont lieu (Chilcott et Pillai, 1985).

Les problèmes environnementaux occasionnés par l'élimination finale des grandes quantités de boues d'épuration, qui augmentent sans cesse, relèvent un défi pour trouver d'autres moyens de disposition. En considérant les propriétés physico-chimiques des boues d'épuration, leur disponibilité et leur moindre coût, il est nécessaire de tirer profit de ces avantages et de trouver une nouvelle façon de les réutiliser. Il est donc possible de poser les hypothèses suivantes:

- a) *Bacillus thuringiensis* est une bactérie qui peut utiliser facilement différents types de sources de carbones et d'azote pour sa croissance, sa sporulation et la production de la δ -endotoxine.
- b) les boues d'épuration sont un matériel économique, disponible et qui contiennent les éléments pouvant permettre de le considérer comme un substrat viable pour la production du bioinsecticide *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis représente actuellement une alternative plus écologique pour contrôler les insectes nuisibles et sa production dépend surtout des coûts du milieu de culture. Si des bons résultats sont obtenus au point de vue production de *B. thuringiensis* à partir des boues d'épuration, deux problèmes environnementaux seront solutionnés: la production plus économique d'un bioinsecticide, ce qui le rendra plus accessible aux utilisateurs et d'un autre point de vue, une nouvelle façon de recycler les boues.

1.4 But de la recherche

Le but du présent travail est de démontrer que les boues des usines d'épuration peuvent être employées comme moyen alternatif de culture pour la production du bioinsecticide *Bacillus thuringiensis*. Le but principal de ce projet de recherche comprend les objectifs spécifiques suivants:

- Connaître les caractéristiques physico-chimiques des boues de différents types et origines qui seront employées dans la production du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis*.
- Réaliser des essais avec différents types des boues des usines d'épuration qui seront utilisées comme milieu de culture pour la croissance et la production du complexe spores-cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Cette variété est actuellement la plus utilisée dans les préparations commerciales de ce biopesticide pour le contrôle des larves de lépidoptères, étant donné son potentiel entomotoxique. Au Canada elle est employée pour le contrôle des insectes ravageurs des forêts, surtout de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.
- Évaluer l'influence d'un prétraitement sur la production du complexe spores-cristaux, en utilisant comme prétraitement l'hydrolyse à l'aide de l'acide sulfurique.
- Déterminer la cinétique de croissance de la bactérie dans ce milieu alternatif de culture.
- Déterminer le potentiel entomotoxique du bioinsecticide obtenu à partir des boues.
- Évaluer l'influence de paramètres de fermentation (pH, température, agitation) sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux.

- Déterminer le développement du potentiel entomotoxique au cours de la croissance et la sporulation de la bactérie
- Réaliser la caractérisation génétique de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 obtenu à partir des cultures réalisées en utilisant les boues d'épuration comme milieu alternatif de culture.

2. MÉTHODOLOGIE

Pour faciliter la compréhension de ce chapitre, les méthodes utilisées dans cette étude sont décrites en suivant l'ordre des expériences réalisées. Il y a des méthodes qui ont été employées dans toutes les expériences, donc elles se trouvent regroupées dans la section de méthodes générales et seront seulement citées sans reprendre leur explication chaque fois qu'elles seront mentionnées. Il faut indiquer que la souche *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 provenant de la collection de H. T. Dulmage a été utilisée comme souche de référence pour toutes les expériences. Cette variété est la plus utilisée actuellement en raison de son potentiel entomotoxique contre une grande variété de larves de lépidoptères. En particulier au Québec, les préparations à base de cette bactérie sont utilisées pour lutter contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

2.1 Méthodes générales

2.1.1 Préparation de l'inoculum de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1

La souche a été conservée à 4 °C dans une gélose trypticase soya et extrait de levure (TSAY, Tryptic soy broth, agar and yeast) constituée de 1.5% (v/v) d'agar, 3% (v/v) de TSB (Tryptic soy broth) et 0.3% (v/v) d'extrait de levure.

Pour l'obtention de l'inoculum destiné à ensemercer tous les échantillons, un milieu liquide à base de TSB et d'extrait de levure a été employé. Dans un Erlenmeyer de 250 mL, 50 mL d'eau distillée ont été déposés avec 3% (v/v) de TSB (Tryptic soy broth) et 0.3% (v/v) d'extrait de levure. Le milieu est stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes. Une fois le milieu refroidi, une colonie de *B. thuringiensis* fut prélevée stérilement du milieu TSAY etensemencée dans les 50 mL du milieu TSB le tout incubé à 30 °C sous agitation constante (250 rpm) pendant 16-18 hs. Les échantillons ont étéensemencés soit avec une suspension contenant 1000 UFC/mL préparée à partir de l'inoculum ou en utilisant 5% v/v de cet inoculum.

2.1.2 Dénombrement de *B. thuringiensis* (compte total viable et compte de spores)

La technique d'ensemencement direct sur milieu gélosé fut réalisée en faisant des dilutions décimales successives de l'échantillon pour déterminer le compte total viable et le compte de spores de *B. thuringiensis* dans les boues, le milieu de farine de soja et le milieu TSB.

Pour le dénombrement du compte total viable, un volume de 0.5 mL de l'échantillon correspondant a été prélevé de l'Erlenmeyer et dilué dans un tube contenant 4.5 ml de saline (NaCl 0.85%) préalablement stérilisée. Cette suspension est bien mélangée à l'aide d'un vortex et ensuite un volume de 0.5 mL est prélevé de cette dilution et dilué dans un autre tube contenant la même quantité de saline, soit 4.5 mL. La même opération est réalisée afin d'obtenir les dilutions convenables. Un aliquote de 0.1 mL est étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu solide TSAY. Ces étalements sont réalisés en double, et ce, pour les trois dernières dilutions. Les Pétris sont incubés à $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Le décompte de colonies est fait avant l'obtention de colonies matures (environ après 20-24 heures d'incubation). Seuls les résultats compris entre 30 et 300 colonies sont retenus pour évaluer le nombre de bactéries /mL (UFC/mL).

Pour le dénombrement de spores viables, les trois dernières dilutions préparées pour la détermination du compte total viable ont été employées. Ces dilutions sont chauffées dans un bain marie à 65°C pendant quinze minutes (Mummigatti et Raghunathan, 1990). Un aliquote de 0.1 mL de ces dilutions est étalé dans une boîte de Pétri contenant du milieu solide TSAY. Ces étalements sont faits en duplicata. Les Pétris sont incubés à l'invers à $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le décompte est fait après 20-24 heures et les résultats compris entre 30 et 300 colonies sont utilisés pour évaluer le nombre de spores/ml (UFC/mL).

2.2 Échantillonnage des boues

Les caractéristiques des boues des usines de traitement varient en fonction de leur origine, du point de traitement où elles sont échantillonnées ou si elles ont subi un traitement de stabilisation. Leur contenu en carbone et azote disponibles pour *B. thuringiensis* varie selon ces conditions. Afin de déterminer si *B. thuringiensis* était capable de croître dans des boues de différents types et origines, des boues d'origine municipale provenant de six usines d'épuration de la province de Québec et deux d'origine industrielle provenant d'une usine de pâtes et papiers (production PTMB, pâte thermo-mécanique blanchie) ont été testées. Tous les échantillons ont été prélevés dans des contenants de polypropylène et conservés à 4 °C jusqu'à leur emploi. La liste de ces boues est décrite dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 Boues des usines d'épuration employées comme milieu de culture pour *B. thuringiensis*

Boue et code	Origine	Type
Valcartier (ValP)	Municipal	Primaire
Black Lake (BLS)	Municipal	Secondaire
Black Lake (BLDA)	Municipal	Secondaire digérée aérobie
Beauceville (BVS)	Municipal	Secondaire
Sainte Claire(SCS)	Municipal	Secondaire
Usine de pâtes et papiers (PPS)	Industriel	Secondaire
Usine de pâtes et papiers (PPRMS)	Industriel	Secondaire d'un réacteur à membranes
Jonquière (JS)	Municipal	Secondaire

2.2.1 Caractérisation de boues

Les solides totaux (ST), les solides volatils (VS), les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspensions (MVES) ont été mesurés selon les méthodes standards (APHA *et al.*, 1989). Les MES et MVES ont été déterminés à partir des culots obtenus par centrifugation de 30 mL de boue à 7600 g pendant 15 minutes et ce pour chaque boue.

La méthode de digestion des boues d'épuration en utilisant l'acide nitrique ACS, l'acide hydrofluorhydrique ACS et le peroxyde d'hydrogène (MENVIQ 89.12/213-mét. 1.3) a été employée pour obtenir les solutions contenant les métaux à analyser, soit Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Z. Les analyses ont été réalisées par spectrophotométrie à émission de plasma (ICP) (spectrophotomètre modèle Atom Scan 25 de Thermo Jarrell Ash Corporation) selon la méthode 305 de Standard Methods. L'estimation des concentrations des métaux a été vérifiée par digestion d'un matériel de référence MESS-1, préparé par le Conseil National de Recherches du Canada.

La technique de digestion avec du persulfate a été employée pour la détermination du phosphore total. La filtration avec des filtres de 0.45 µm de diamètre a été utilisée pour l'obtention des composés dissouts. Les analyses ont été réalisées selon la technique automatisée du Technicon autoanalyser II (industrial method No. 94-70W), basée sur la méthode 424 G de Standard Methods. L'azote ammoniacal a été déterminé selon la technique automatisée du Technicon autoanalyser II (industrial method No. 98-70N), basée sur la méthode 417 G de Standard Methods.

Le carbone organique total a été évalué par la technique automatisée du Technicon autoanalyser II (industrial method No. 455-76W/a) basée sur la méthode 505 B de Standard Methods. Pour la détermination du carbone organique dissout, l'échantillon a été filtré en utilisant des filtres de 0.45 µm de diamètre. Finalement, le pH a été mesuré au laboratoire avec un pH-mètre Fisher Accumet 805 MP.

2.3 Traitement des boues

Il semblait important d'évaluer si un prétraitement simple pouvait améliorer la performance des boues pour soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis*. Comme les boues d'épuration contiennent une partie de la matière organique sous forme de macromolécules, elle n'est pas disponible pour la bactérie, mais l'action d'un prétraitement pouvait la rendre plus assimilable. L'hydrolyse par l'acide sulfurique a donc été choisie comme prétraitement chimique. En plus,

l'autoclavage des boues peut améliorer l'effet de l'hydrolyse sur la décomposition de la matière organique qu'elles contiennent. En tenant compte des avantages du prétraitement, les boues d'épuration ont été testées de trois façons différentes:

- complètes (solides et liquide) sans prétraitement à l'acide sulfurique et subissant seulement l'autoclavage;
- complètes (solides et liquide) avec le prétraitement chimique (hydrolyse) et l'autoclavage;
- seulement le surnageant obtenu après le prétraitement à l'acide sulfurique et la centrifugation de l'échantillon.

2.3.1 Boues complètes sans prétraitement

Un volume de 25 mL de la boue est placé dans un Erlenmeyer de 50 mL et stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante avant d'être utilisé.

2.3.2 Boues complètes avec prétraitement chimique

Un volume de 25 mL de la boue est placé dans un Erlenmeyer de 50 mL. L'acide sulfurique dilué 1N est ajouté jusqu'à pH 2. Les quantités d'acide sulfurique nécessaires pour hydrolyser à pH 2 ont varié selon le pH initial de chacune des boues. L'échantillon est stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Avec une solution d'hydroxyde de sodium 1N, le pH est ajusté à 7 et l'échantillon stérilisé aux conditions déjà mentionnées, puis refroidi à la température ambiante avant d'être employé. Encore ici, les quantités nécessaires pour remonter le pH à 7 ont varié d'une boue à l'autre.

2.3.3 Surnageants des boues

Pour l'obtention du surnageant, 50 mL de la boue sont placés dans un Erlenmeyer de 250 mL et hydrolysés en suivant ce qui a été décrit dans la section 2.3.2. Après refroidissement, 30 mL de la boue sont transférés dans un tube de 50 mL de

polypropylène, centrifugés à 4500 rpm pendant 20 minutes à 4 °C (centrifugeuse Sorvall superspeed RC2-B). Un volume de 25 mL du surnageant est recueilli dans des Erlenmeyers de 50 mL pour être ensuite utilisé.

2.4 Effet du prétraitement des boues d'épuration sur la production de *B. thuringiensis*

Les boues de Valcartier (ValP), Black Lake (BLS), digérée de Black Lake (BLDA), Beauceville (BV), Sainte Claire (SCS) et les boues secondaires de l'usine de pâtes et papiers (PPS et PPRMS) ont été préparées comme décrit dans les sections 2.3.1., 2.3.2. et 2.3.1. Les échantillons sontensemencés avec 1mL d'une suspension contenant 1000 UFC/mL de *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1. Une fois inoculés, ils sont incubés à température et agitation constantes (30 °C et 250 rpm). Les comptes totaux viables et des spores sont déterminés chaque jour selon les procédures mentionnées en 2.1.2. jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. Les échantillons sont gardés au froid (-20 °C) jusqu'à leur utilisation pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

2.5 Influence du pH et de la température

Pour évaluer l'influence du pH et de la température sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spore-cristaux par *B. thuringiensis*, trois expériences différentes ont été réalisées avec la boue de Jonquière. La première consistait à hydrolyser la boue à trois pH différents et pour chacun des pH, à effectuer la fermentation à quatre températures différentes. La deuxième consistait à maintenir le pH constant dans la boue pendant la fermentation à l'aide d'une solution tampon. La troisième expérience consistait à donner un choc thermique à l'échantillon une fois atteinte la phase de croissance exponentielle de la bactérie.

2.5.1 Expériences avec différents pH d'hydrolyse et différentes températures de fermentation

Quatre Erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL de la boue de Jonquière ont été utilisés. Le pH des échantillons de boue a été ajusté à l'aide d'acide sulfurique dilué 1N à 2,4,6 et un échantillon a été laissé à son pH original (pH=7) pour pouvoir évaluer l'influence de l'hydrolyse. Les quatre échantillons ont été autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes.

Après ajustement du pH à 7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1N, les échantillons sont autoclavés aux mêmes conditions (121 °C pendant 20 minutes). L'échantillon autoclavé au pH original (pH=7) n'a subi aucun ajustement postérieur du pH. Une fois refroidis, les quatre échantillons ont été ensemencés avec 5% v/v de l'inoculum préparé selon ce qui est décrit dans la section 2.1.1. et ils ont été incubés à 30 °C sous une agitation constante de 250 rpm. Chaque jour un prélèvement de 0.5 mL des échantillons a été réalisé afin de déterminer le compte total viable et des spores selon les techniques décrites dans 2.1.2. jusqu'à la sporulation maximale. Les échantillons finaux ont été préservés au froid (-20 °C) jusqu'à la réalisation des bioessais pour la détermination du potentiel entomotoxique.

Après avoir terminé un groupe de 4 échantillons à une température constante de fermentation, un autre groupe a été préparé dans les mêmes conditions d'ajustement du pH. L'incubation a été réalisée sous le même régime d'agitation (250 rpm) mais cette fois la température d'incubation était 32 °C. Les expériences ont été répétées aux températures d'incubation de 34°C et 36°C avec deux autres groupes de quatre échantillons, toujours en utilisant le même niveau d'agitation. Les comptes viables et de spores ont été réalisés à la même fréquence et conditions qu'avec l'échantillon à 30 °C et jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie dans chacun des échantillons. Tous les échantillons finaux ont été gardés au froid (-20 °C) jusqu'au moment de la réalisation des bioessais.

2.5.2 pH constant au cours de la fermentation

Pendant la croissance, certains produits métaboliques peuvent modifier le pH du milieu de culture. L'influence d'un pH constant pendant la fermentation de *B. thuringiensis* a été étudié en ajoutant des solutions tampons dans la boue de Jonquière avant d'être ensemencée avec *B. thuringiensis*. Deux solutions tampons ont été utilisées: la solution TRIS et la solution PBS.

Un volume de 60 mL de la boue de Jonquière et 15 mL de la solution tampon TRIS 0.01 M sont déposés dans un Erlenmeyer de 250 mL. Ensuite l'échantillon est stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes. La boue est ensemencée avec 5 % (v/v) de l'inoculum préparé selon ce qui est décrit dans la section 2.1.1 et incubé à température et agitation constantes (32 °C et 250 rpm). Les comptes viables et de spores sont déterminés à intervalles de trois heures jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie dans l'échantillon selon les techniques décrites dans 2.1.2. Les échantillons finaux sont préservés au froid (-20 °C) afin de les utiliser dans les bioessais pour la détermination du potentiel entomotoxique.

La même démarche a été réalisée avec un autre échantillon de la boue de Jonquière mais contenant la solution tampon PBS 0.01M (15 mL) et finalement afin de pouvoir comparer l'effet du contrôle du pH pendant la fermentation, un troisième échantillon de la boue de Jonquière a été traité sous les mêmes conditions, mais de l'eau distillée stérile a été ajoutée à la place du tampon.

2.5.3 Application d'un choc thermique pendant la fermentation

Un volume de 60 mL de la boue de Jonquière et 15 mL de la solution tampon TRIS 0.01M ont été placés dans un flacon Erlenmeyer de 250 mL et stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes. Une fois refroidi, l'échantillon a été ensemencé avec 5% (v/v) de l'inoculum préparé selon la section 2.1.1. et incubé sous température et agitation constantes (32 °C et 250 rpm). Après 24 heures, et selon les résultats obtenus dans les expériences de la section 2.5.2, la phase de croissance exponentielle de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière avec contrôle du pH était déjà accompli et à ce moment la température a été diminuée à 25 °C afin de promouvoir une sporulation plus efficace dans le milieu de

culture. Les comptes viables et de spores ont été déterminés toutes les trois heures dès le début de l'expérience jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie selon les techniques décrites dans 2.1.2. L'échantillon final a été gardé au froid (- 20 °C) pour réaliser la détermination du potentiel entomotoxique. Pour comparer les résultats du choc thermique obtenus avec contrôle du pH avec ceux sans contrôle, un autre échantillon de la boue de Jonquière a été traité selon la même procédure, en additionnant un volume équivalent d'eau distillée en lieu de la solution tampon TRIS. La variation de la température a été réalisée aussi à 24 heures.

2.6 Influence de l'agitation

L'évaluation de l'influence de l'agitation sur la production du bioinsecticide *B. thuringiensis* a été réalisée en quatre expériences avec différents niveaux d'agitation. Pour ce faire, quatre séries de deux échantillons ont été soumises à 4 niveaux différents d'agitation. Les niveaux d'agitation choisis étaient 50 rpm, 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm. Comme le contrôle du pH pendant la fermentation peut avoir aussi une influence, un échantillon contenant la solution tampon TRIS a été utilisé ainsi qu'un autre sans tampon pour pouvoir comparer les différences (en croissance, sporulation et production de δ -endotoxine) avec ou sans contrôle du pH. Dans un Erlenmeyer de 250 ml on dépose 60 mL de la boue de Jonquière et 15 mL de la solution tampon TRIS; un autre Erlenmeyer contenant 60 mL de la boue de Jonquière et 15 mL d'eau distillée stérile sont aussi préparés et les deux contenants stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes. Une fois refroidis, les échantillons sontensemencés avec 5% (v/v) de l'inoculum de *B. thuringiensis* préparé selon ce qui est décrit dans la section 2.1.1. et incubés sous température et agitation constantes (32 °C et 50 rpm). Les comptes viables et de spores sont déterminés selon les techniques décrites dans 2.1.2. toutes les trois heures jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. L'échantillon final de chacun des flacons a été gardé au froid (-20 °C) jusqu'à la réalisation des bioessais pour déterminer le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu.

Un autre paire d'échantillons de la boue de Jonquière a été préparée, un additionné de la solution TRIS et l'autre additionné avec de l'eau distillée stérile. Ils ont été stérilisés et ensemencés comme décrit dans le paragraphe précédent. La culture a été réalisée à la température de 32 °C mais le niveau d'agitation a été modifié à 150 rpm. Les comptes viables et de spores ont été déterminés selon les techniques décrites dans la section 2.1.2. à intervalles de trois heures jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. L'échantillon final de chacun des flacons a été gardé au froid (-20 °C) jusqu'à la réalisation des bioessais pour déterminer le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu. La même démarche a été reprise deux fois de plus, mais en fixant les niveaux d'agitation à 250 rpm et à 350 rpm.

2.7 Influence des sources additionnelles de nutriments

L'addition de nutriments dans les boues et leur influence sur la croissance, la sporulation et la production de δ -endotoxine par *B. thuringiensis* ont été étudiées avec la boue secondaire de Black Lake (BLS) en utilisant le glucose comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote et de vitamines. Deux types d'expériences ont été réalisés: un groupe d'échantillons recevant le glucose comme source additionnelle de carbone et un autre groupe en utilisant le glucose comme source de carbone et l'extrait de levure comme source additionnelle d'azote et de vitamines.

Pour la réalisation de la première expérience (addition du glucose) six Erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL de la boue secondaire de Black Lake ont été employés. Cinq Erlenmeyers ont été additionnés de 40 mg/L, 80 mg/L, 120 mg/L, 160 mg/L et 200 mg/L de glucose et le sixième échantillon a été utilisé comme témoin pour comparer les changements dans la croissance, la sporulation et la production de δ -endotoxine dans des échantillons contenant du glucose avec l'échantillon sans ce nutriment. Les six échantillons ont été stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes, puis refroidis et ensemencés avec un mL d'une suspension contenant 1000 UFC/mL de l'inoculum préparé selon la démarche décrite en 2.1.1. Les échantillons ont été incubés sous température et agitation

constantes (30 °C et 250 rpm). Les comptes viables et de spores ont été déterminés chaque jour selon les techniques décrites dans la section 2.1.2. jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. L'échantillon final de chacun des flacons a été gardé au froid (-20 °C) jusqu'à la réalisation des bioessais pour déterminer le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu.

Pour les expériences faites avec une source additionnelle de carbone, d'azote et de vitamines, 50 mL de la boue secondaire de Black Lake (BLS) ont été introduits dans 5 Erlenmeyers. Les échantillons ont été additionnés de 40 mg/L, 80 mg/L, 120 mg/L, 160 mg/L et 200 mg/L de glucose et 40 mg/L d'extrait de levure ont été additionnés à chacun d'eux. Un autre flacon contenant seulement 50 ml de la boue secondaire de Black Lake (BLS) a été utilisé comme témoin afin de pouvoir évaluer les différences avec ou sans nutriments additionnels. Les six échantillons ont été stérilisés à 121 °C pendant 20 minutes. Une fois refroidis, ils ont étéensemencés avec un mL d'une suspension contenant 1000 UFC/mL de l'inoculum préparé selon la démarche décrite en 2.1.1. Les échantillons ont été incubés sous température et agitation constantes (30 °C et 250 rpm) Les comptes viables et de spores ont été déterminés chaque jour selon les techniques décrites dans la section 2.1.2. jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. L'échantillon final de chacun des flacons a été gardé au froid (-20 °C) jusqu'à la réalisation des bioessais pour déterminer le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu.

2.8 Cinétique de croissance de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration

Les taux spécifiques de croissance de *B. thuringiensis* dans la boue primaire de Valcartier (ValP), secondaire de Black Lake (BLS), secondaire de Beauceville (BVS), secondaire de Sainte Claire (SCS), secondaire du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS) et secondaire de la même usine (PPS) ont été déterminés en utilisant les résultats des décomptes totaux obtenus dans la section 2.4 selon la technique décrite dans la section 2.1.2. Les décomptes totaux effectués dans les expériences des sections 2.5 et

2.6 ont été utilisés pour mesurer la croissance (taux spécifique de croissance) de cette bactérie dans la boue secondaire de Jonquière. Finalement, les résultats des décomptes totaux de *B. thuringiensis* effectués dans les expériences décrites dans la section 2.7 ont été utilisés pour déterminer le taux spécifique de croissance de la bactérie dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) quand des sources additionnelles de nutriments ont été ajoutés à cette boue.

2.9 Détermination de l'entomotoxicité

Le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus à la fin de chacune des fermentations réalisées avec les boues d'épuration et conservés au froid (-20 °C) a été déterminé par la réalisation des expériences *in vivo*, soit des bioessais.

2.9.1 Insecte cible et élevage

L'insecte cible utilisé pour évaluer l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 en utilisant les boues d'épuration dans les bioessais mentionnés dans les sections 2.4, 2.5, 2.6 et 2.7 était la larve de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) (*Choristoneura fumiferana*), *Lepidoptera: Tortricidae* de stade L3-L4. Les larves de deuxième âge de TBE provenant du Ministère des Ressources Naturelles Canada étaient gardées au froid (4 °C) jusqu'à leur élevage. La procédure d'élevage est décrite dans l'Annexe B.

2.9.2 Préparation de la diète

Deux techniques d'incorporation du complexe spores-cristaux dans la diète utilisée dans les bioessais ont été employées. La technique de la contamination de la surface de la diète solide (composition dans l'Annexe C) et la technique de l'incorporation du complexe spores-cristaux dans la diète liquide (composition dans l'Annexe D). Les deux étant des techniques reconnues pour la réalisation de bioessais (Beegle, 1990). Les bioessais faits avec les deux techniques sont basés sur le modèle américain utilisant comme référence la

souche *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 pour déterminer l'entomotoxicité d'un produit envers les larves des lépidoptères (Dulmage *et al.*, 1971).

2.9.2.1 Technique de contamination de la surface de la diète artificielle avec *B. thuringiensis*

Un volume de 1 µl de la boue contenant le complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* a été étalé sur 1 mL de diète solide contenu dans 20 tubes. La même opération a été répétée en étalant 2 µl et 3 µl du même échantillon dans deux autres groupes de 20 tubes contenant la diète. La même démarche a été reprise en étalant le milieu de référence (de la farine de soja, composition dans l'Annexe E, contenant du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis* obtenu à 30 °C et 250 rpm) et la préparation commerciale Foray 48B. Comme contrôle, un volume de 1 µl d'eau distillée stérile a été étalé dans la diète contenue dans 50 tubes. Cette technique a été employée pour préparer la diète pour les bioessais réalisés avec des échantillons de boue contenant les complexes spores-cristaux obtenus dans les expériences décrites dans les sections 2.4 et 2.7.

2.9.2.2 Technique d'incorporation du *B. thuringiensis* dans la diète

Cinq dilutions décimales successives ont été préparées dans des tubes contenant 4.5 mL d'une solution de NaCl 0.85% stérile pour la boue de Jonquière contenant le complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis*. Un volume de 1 mL de la première dilution est incorporé dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant 10 mL de la diète liquide et 10 mL d'une solution d'agar à double concentration (3% v/v). Le tout est bien mélangé et 1 mL est déposé dans 20 tubes. La même opération est réalisée avec les quatre dilutions restantes. Des séries de cinq dilutions de la boue de Jonquière sans *B. thuringiensis*, du milieu de référence farine de soja et de la préparation commerciale (Foray 48B) sont préparées de la même façon, incorporées dans des mélanges de diète et agar et déposées dans des tubes comme il a été décrit précédemment. Comme contrôle 2.5 mL d'eau distillée stérile ont été incorporés dans 25 ml de diète liquide et 25 mL d'agar. Après avoir mélangé, 1 mL a été déposé dans 50 tubes. Cette technique de préparation de la

diète a été utilisée pour déterminer le potentiel entomotoxique de chacun des complexes spores-cristaux obtenus à partir de la boue de Jonquière dans les expériences décrites dans les sections 2.5 et 2.6.

2.9.3 Bioessais

Une fois les tubes de la diète préparés, une larve de stade L3-L4 de TBE était introduite dans chacun d'eux. Les tubes ont été incubés à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et la mortalité des larves a été vérifiée toutes les 24 heures jusqu'au vingtième jour et employée comme une indication du potentiel obtenu (Salama *et al.*, 1983). Si la mortalité des larves dans les tubes de l'eau témoin était supérieure à 10%, l'expérience était reprise. La moyenne du pourcentage de mortalité obtenue avec les différents quantités de boue additionnée à la diète artificielle a été comparée avec la moyenne du pourcentage de mortalité obtenue avec le milieu commercial Foray 48B. Etant donnée que ce milieu a un potentiel de 12600 UI/ μL , le potentiel des différentes préparations a été obtenu en utilisant des proportions directes entre la moyenne de mortalité obtenu avec la boue et le milieu commercial. Les UI (unités internationales) sont les unités biologiques employées pour exprimer le potentiel d'une préparation de Bt.

2.9.4 Développement de l'entomotoxicité au cours de la fermentation

Pour étudier le développement de la toxicité au cours de la croissance de *B. thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture, les échantillons obtenus à partir de la boue de Jonquière pendant les expériences décrites dans la section 2.5.2 ont été utilisés. Les échantillons obtenus aux intervalles de trois heures ont été incorporés dans la diète liquide selon la technique décrite dans la section 2.9.2.2. et les bioessais se sont déroulés selon ce qui est indiqué dans la section 2.9.3. Des courbes montrant le développement du potentiel entomotoxique au cours de la croissance et de la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière ont ainsi été obtenues.

2.10 Caractérisation génétique de *B. thuringiensis* HD-1

Cette partie du projet de recherche portait sur la vérification de la présence des gènes codant pour l'entomotoxicité chez *B. thuringiensis* quand cette bactérie a été cultivée dans les boues d'épuration. La technique utilisée est la polymérisation en chaîne de l'ADN (Polymerase Chain Reaction) qui permet de différencier chaque gène CryIA contenu dans l'ADN plasmidique du *B. thuringiensis* en utilisant trois paires d'amorces spécifiquement sélectionnées (Bourque *et al.*, 1993) pour les identifier.

2.10.1 Description de la polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)

La PCR consiste à copier jusqu'à un milliard de fois, dans un tube à essai, un fragment du génome à étudier. Les fragments d'ADN contiennent deux brins assemblés en double hélice. Chaque brin est constitué de l'enchaînement d'une grande quantité de composants élémentaires, les nucléotides (A, T, C, G). Les séquences des deux brins sont complémentaires. Cette complémentarité est très importante car lorsque les liaisons sont rompues, par exemple par la chaleur, les deux brins sont capables de se réassocier, en reproduisant l'appariement de départ. C'est cette propriété d'appariement spécifique de séquences complémentaires qui est utilisée dans la PCR.

La technique est basée sur l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase produite par *Thermus aquaticus*, (TAQ polymérase), capable de copier en prenant l'un des brins comme modèle, un nouveau brin formé de nucléotides complémentaires. Comme l'enzyme est capable de résister aux hautes températures nécessaires pour briser la chaîne de l'ADN ceci permet de faire de nombreux cycles d'amplification sans le remplacer. En plus de l'échantillon d'ADN à amplifier, la réaction comprend l'addition d'un tampon, des nucléotides triphosphates et d'une paire d'amorces spécifiques pour la séquence cible et l'enzyme.

2.10.2 Procédure pour l'obtention de l'ADN

Les échantillons des boues du Tableau 2.1 ont été employés pour la réalisation de ces expériences avec ou sans prétraitement (hydrolyse), sauf la boue de Jonquière qui a été employée sans prétraitement. La préparation des échantillons a été réalisée selon ce qui est indiqué dans les sections 2.3.1 et 2.3.2. et ceux-ci ont étéensemencés avec 5% v/v de l'inoculum de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 préparé selon ce qui est décrit dans la section 2.1.1. Ils sont incubés à 30 °C et agitation constante (250 rpm) jusqu'à la sporulation maximale de la bactérie. Un volume de 0.5 ml de la boue a été prélevé chaque jour de l'Erlenmeyer et dilué dans 4.5 mL d'une solution saline (NaCl 0.85%) préalablement stérilisée. Un volume de 1 mL de cette dilution a été étalé sur un Pétri contenant du milieu TSAY et incubé à 30 °C pendant 24 heures. La culture obtenue a été utilisée pour préparer l'ADN pour la PCR. Seules les cultures représentant le premier jour de fermentation de *B. thuringiensis* dans chacune des boues et les trois derniers jours de fermentation ont été utilisées pour évaluer la présence des trois gènes (CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c)). Le premier prélèvement a servi comme témoin positif et les trois derniers représentaient la souche obtenue dans le milieu alternatif.

À partir de chacune de ces cultures, une colonie a été prélevée et déposée dans un tube contenant le milieu TSB. Ces tubes ont été incubés à 30 °C pendant 16-18 heures sous agitation constante (250 rpm). Un aliquot de 100 µl de ces cultures ont été prélevés, placés dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 4 °C pendant 10 minutes à 17,000 rpm (25,850 g). Les surnageants ont été rejetés et les culots contenant les cellules de *B. thuringiensis* remis en suspension dans 200 µl d'eau distillée stérile. La lyse de cellules a été faite par choc thermique (placer les tubes Eppendorf pendant 30 minutes à - 80 °C; ensuite à ébullition pendant 5 minutes au bain marie bouillant et répéter l'opération deux fois). Une fois refroidis à 4 °C, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 17,000 rpm, les surnageants rejetés et les culots contenant l'ADN à analyser remis en suspension dans 40 µL d'eau distillée stérile.

2.10.3 Amplification de l'ADN

Les amplifications de l'ADN ont été réalisées dans un volume final de 50 μL qui contenaient 2 μL de l'ADN obtenu dans l'étape précédente, 2 μL de chacune des amorces (une paire, 0.75 μM) et 44 μL du mastermix (préparation dans l'Annexe F). Les échantillons ont été mis dans l'appareil "DNA thermal cycler" (Perkin-Elmer Cetus, Montréal, Québec, Canada) préchauffé à 94 °C et programmé selon les cycles indiqués dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 Conditions d'amplification de l'ADN

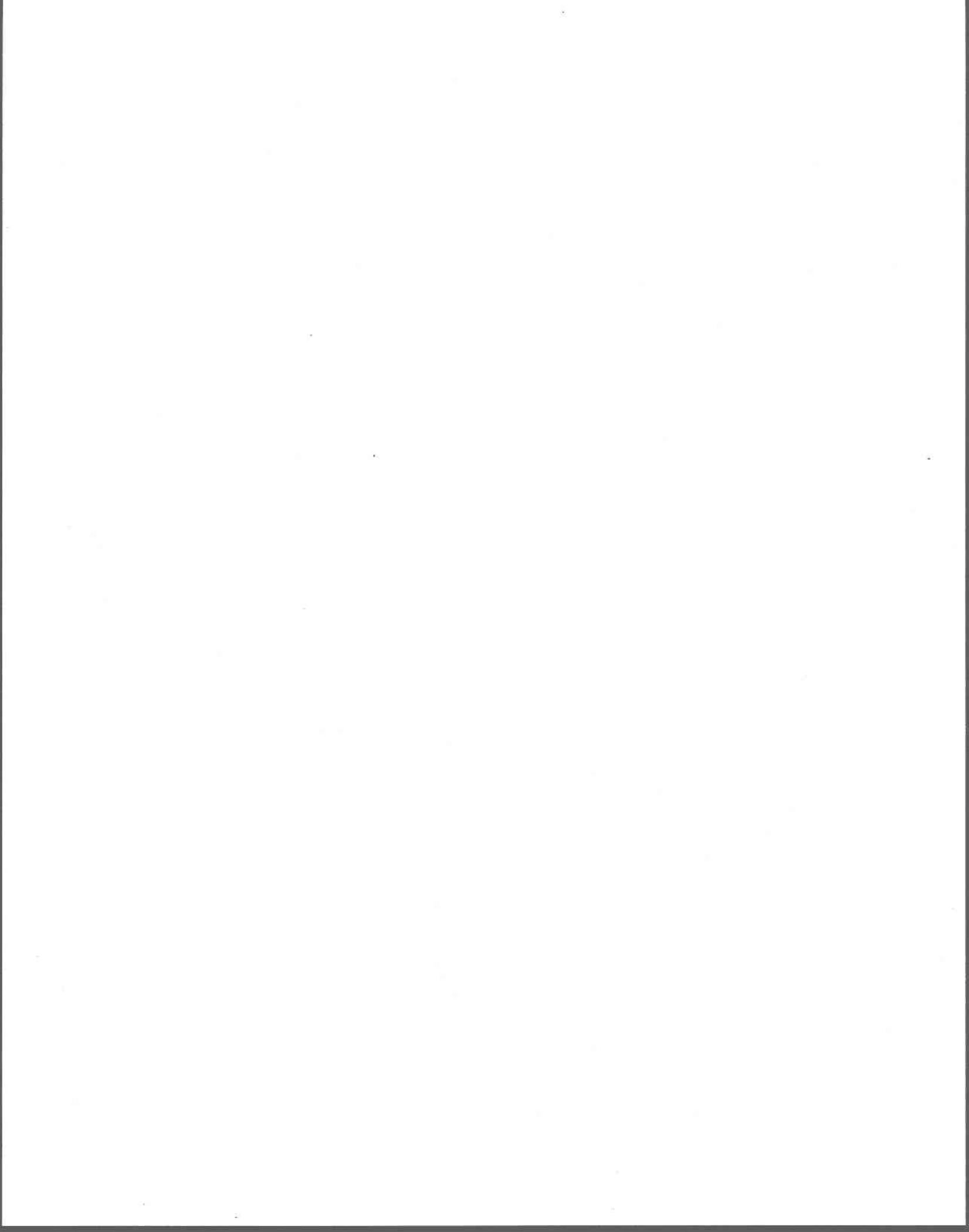
Cycles	Dénaturation à 94 °C	Hybridation à 45 °C	Polymérisation à 72 °C
1 ^{er} cycle	5 minutes		
Cycles suivantes (45)	1 minute	2 minutes	3 minutes

2.10.4 Analyse de l'ADN amplifié

Les fragments d'ADN obtenus par la PCR sont en quantité telle qu'il est possible de les révéler directement par électrophorèse. Cette technique consiste à faire migrer l'ADN sur une plaque de gel de polyacrylamide ou d'agarose sous l'action d'un champ électrique, ce qui sépare les molécules en fonction de leur taille; les plus gros migrent le moins loin. Comme l'ADN est chargé négativement à un pH neutre, il va migrer vers l'anode.

Un volume de 10 μL a été prélevé des tubes Eppendorf contenant les produits de l'amplification et mélangés avec 2 μL de bleu de bromophénol et de xylène-cyanol et puis déposés dans les puits d'un gel d'agarose (1%) mis dans le bac à électrophorèse. Une échelle standard a été préparée en prenant 1 μL du ladder 1 Kb, 10 μL d'eau distillée stérile

et 2 μ l du bleu de bromophenol et déposé aussi dans le gel. Les deux électrodes ont été branchées à une source de courant continu et la tension a été réglée sans jamais dépasser 90 volts. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le front de migration atteint les $\frac{3}{4}$ de la longueur du gel. Le gel est mis dans un contenant avec du bromure d'éthidium qui va s'intercaler entre les bases de l'ADN et sous les rayons ultraviolets, les bandes correspondant à chacun de produits obtenus sont mises en évidence par fluorescence ; l'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb) permettant de déterminer la longueur de ces produits.



3. CARACTÉRISATION DU MILIEU DE CULTURE ALTERNATIF POUR *B. thuringiensis*

Les boues d'épuration contiennent plusieurs éléments qui peuvent constituer des facteurs de croissance pour *B. thuringiensis* permettant ainsi de les utiliser comme un milieu alternatif de culture pour la production de ce bioinsecticide. Les caractéristiques de boues de différents types et origines utilisées dans ces expériences sont présentées dans ce chapitre.

3.1 Caractéristiques des boues utilisées

Les caractéristiques physiques et chimiques des boues d'épuration ont été déterminées selon la procédure décrite dans la section 2.2.1. Les résultats des analyses sont présentés dans les sections suivantes.

3.1.1 Caractéristiques physiques

Le Tableau 3.1 montre la concentration en solides contenus dans chacune des boues. Celle qui contient la plus haute concentration en solides totaux (ST) et matières en suspension (MES) est la boue de Beauceville (BVS) avec 43220 mg/L et 37850 mg/L, respectivement, suivie par celle de l'usine de pâtes et papier du réacteur à membranes (PPRMS) avec 32180 mg/L et 28190 mg/L et celle de Black Lake digérée (BLDA) avec 25240 mg/L et 22830 mg/L. La boue qui contient la plus faible concentration de solides totaux et en suspension est celle de Black Lake (BLS), avec 5100 mg/L et 2490 mg/L, respectivement, suivie de la boue de Jonquière (JS) qui a une concentration en solides totaux de 13000 mg/L et en solides en suspension de 12050 mg/L.

Tableau 3.1 Concentration de solides des boues d'épuration

Échantillon	mg/L			
	ST	SV	MES	MVES
Valcartier (ValP)	20430	16340	18610	15876
Black Lake (BLS)	5100	2500	2490	1820
Black Lake digérée (BLDA)	25240	12770	22830	12060
Beauceville (BVS)	43220	21620	37850	19060
Sainte Claire (SCS)	24230	14160	22520	13760
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	20530	16180	15990	15800
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	32180	22600	28190	22080
Jonquière (JS)	13000	9300	12050	8835

Symbologie:

ST: solides totaux

SV: solides volatils

MES: matière en suspension

MVES: matière volatile en suspension

Les pH originaux de chacune des boues d'épuration utilisées comme milieux alternatifs de culture sont montrés dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 pH originaux des boues d'épuration

Échantillon	pH
Valcartier (ValP)	5.5
Black Lake (BLS)	6.5
Black Lake digérée (BLDA)	6.0
Beauceville (BVS)	6.5
Sainte Claire (SCS)	7.0
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	6.5
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	8
Jonquière (JS)	7

La boue primaire de Valcartier (ValP) présente le pH le plus bas parmi toutes les boues, soit 5.5. suivie de la boue digérée de Black Lake (BLDA) qui a un pH=6. Les boues secondaires de Black Lake (BLS), Beauceville (BVS) et de l'usine de pâtes et papiers (PPS) ont un pH de 6.5. La boue de Jonquière présente un pH de 7 et c'est la boue du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS) qui présente le pH le plus alcalin avec 8.

3.1.2 Caractéristiques chimiques

Les paramètres chimiques déterminés sont résumés dans le Tableau 3.3 (en mg/L) et dans le Tableau 3.4 (en mg/kg) sauf les métaux lourds.

Tableau 3.3 Caractéristiques chimiques des boues d'épuration

Échantillon	Paramètres						
	mg/L						
	N-NH ₄	COD	COT	PO ₄	P tot	Al	Ca
Valcartier (ValP)	282	570	1936	128	187	187	162
Black Lake (BLS)	106	166	183	37	73	49	65
Black Lake digérée (BLDA)	402	549	1112	47	295	579	297
Beauceville (BVS)	1058	1572	2048	886	3800	1358	419
Sainte Claire (SCS)	482	176	847	455	1712	632	450
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	266	843	1076	93	158	222	97
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	44	1615	2267	75	109	7	129
Jonquière (JS)	80	n.d. ^a	n.d. ^a	183	282	267	85

^a n.d. = non déterminé

Tableau 3.3 (suite) Caractéristiques chimiques de boues d'épuration

Échantillon	Paramètres					
	mg/L					
	Cd	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn
Valcartier (ValP)	0.06	0.6	8	155	49	2
Black Lake (BLS)	0.01	0.40	4	54	77	1.6
Black Lake digérée (BLDA)	0.1	4.2	31	684.5	775	9.0
Beauceville (BVS)	0.1	3	7	1065	242	60
Sainte Claire (SCS)	0.2	3	9	441	143	19
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	0.005	0.2	0.8	16	22	1.0
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	0.02	0.1	0.6	7	40	3.0
Jonquière (JS)	0.03	0.08	3	14	20	4

Tableau 3.3 (suite) Caractéristiques chimiques de boues d'épuration

Échantillon	Paramètres			
	mg/L			
	Na	Ni	Pb	Zn
Valcartier (ValP)	55	0.3	2	2
Black Lake (BLS)	51	0.5	0.3	2
Black Lake digérée (BLDA)	105	6	3	11
Beauceville (BVS)	254	2	2	12
Sainte Claire (SCS)	127	1	3	18
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	483	0.1	0.1	0.7
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	525	0.04	0.04	2
Jonquière (JS)	n.d. ^a	0.2	1	4

^a n.d. = non déterminé

Tableau 3.4 Caractéristiques chimiques en mg/kg de boue sèche des boues d'épuration

Échantillon	N-NH ₄	COT	PO ₄	Ca	Mg
Valcartier(ValP)	13818	94767	6258	7951	2392
Black Lake digérée (BLS)	20768	35960	7219	12900	15047
Black Lake (BLDA)	15942	44080	1881	11782	30721
Beauceville (BVS)	24476	47385	20507	9709	5599
Sainte Claire (SCS)	19892	34969	18805	18574	5915
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	8283	33437	2902	3026	688
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	1383	70453	2332	4025	1232
Jonquière (JS)	6190	n.d. ^a	21731	6561	1546

^a n.d. = non déterminé

Sur une base sèche c'est la boue de Beauceville (BVS) qui présente la teneur la plus haute en azote N-NH₄ avec 24476 mg/kg et en PO₄ c'est la boue de Jonquière qui présente la

teneur la plus élevée avec 21731 mg/kg. En ce qui concerne la teneur de carbone organique total, c'est la boue de Valcartier (ValP) qui contient la teneur la plus élevée de 94767 mg/kg suivie de la boue du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers avec 70453 mg/kg.

La boue digérée de Black Lake (BLDA) a la teneur la plus élevée de magnésium avec 30721 mg/kg et la boue de Sainte Claire (SCS) avec 18574 mg/kg en calcium présente la plus forte concentration. Les teneurs en métaux lourds sont montrées dans le Tableau 3.5.

Tableau 3.5 Contenu (mg/kg de boue sèche) en métaux des boues d'épuration

Échantillon	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Valcartier(ValP)	9200	3	28	420	7560	106	12	85	93
Black Lake (BLS)	9730	2	80	870	10530	310	97	56	360
Black Lake digérée (BLDA)	23000	7	170	1220	27110	360	4140	120	460
Beauceville (BVS)	31430	3	72	150	24650	1390	37	39	290
Sainte Claire (SCS)	26116	7.5	135	385	18197	799	42	144	751
Pâtes et papiers secondaire (PPS)	6899	0.15	5.7	25.7	495.3	30.6	3.8	4.09	22
Pâtes et papiers réacteur à membranes (PPRMS)	221	0.77	4.3	18.5	219	84.5	1.33	1.1	53.4
Jonquière (JS)	n.d. ^a	2.6	6.3	213	10546	311	18	77	283

^a n.d. = non déterminé

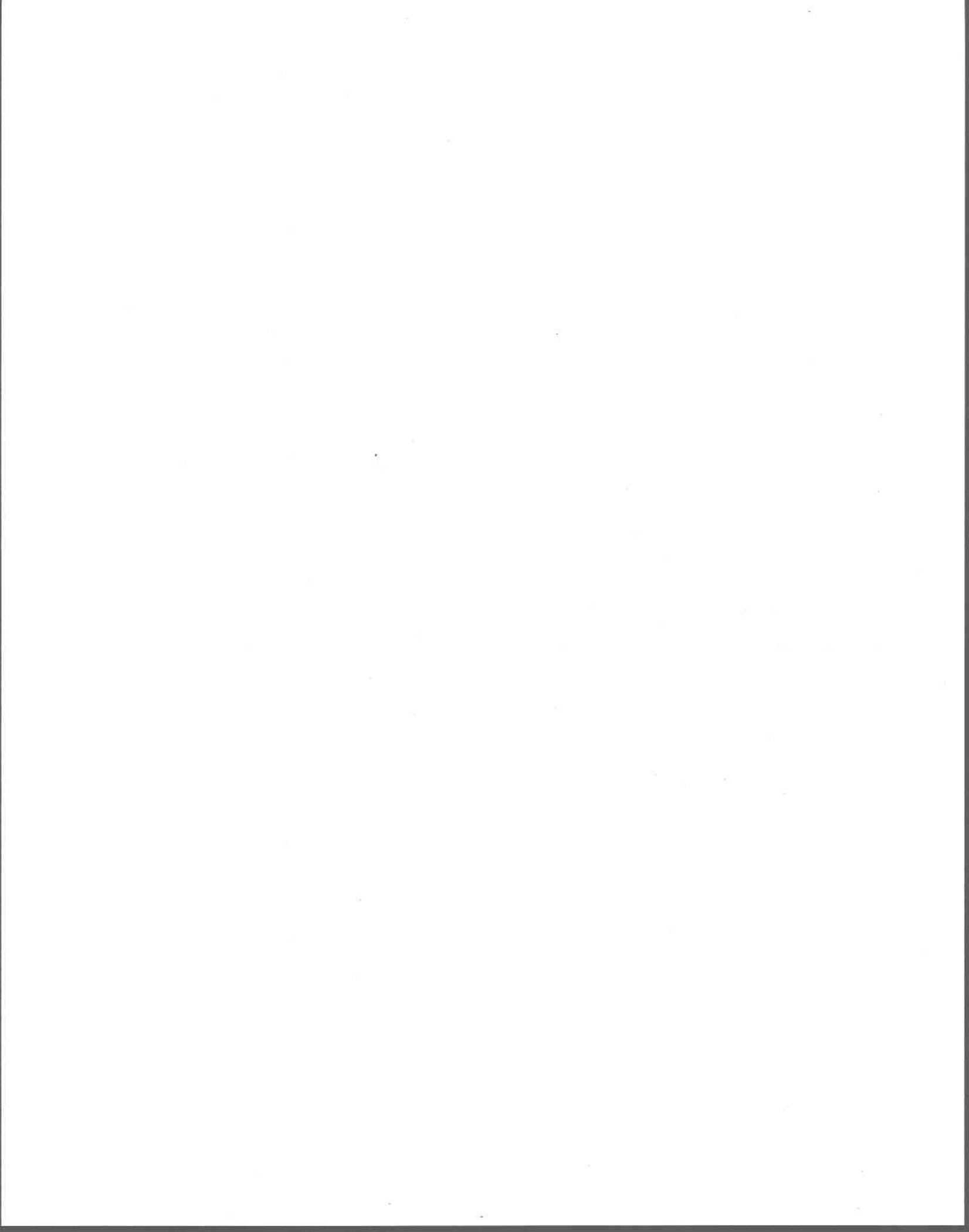
C'est la boue digérée de Black Lake (BLDA) qui contient les plus fortes concentrations de 4 des métaux lourds analysés. Elle contient 1220 mg de cuivre par kg de boue sèche. Pour le chrome et le fer, les teneurs étaient de 170 mg/kg et 27110 mg/kg de boue sèche, respectivement et finalement pour le nickel, la teneur était de 4140 mg/kg. Elle présente aussi une teneur élevée en Cd (7 mg/kg). La haute concentration des métaux dans cette boue s'explique par le fait qu'il s'agit d'une boue digérée, processus qui augmente la concentration des métaux dans la boue. C'est la boue de Beauceville (BVS) qui contient la plus haute teneur en aluminium, soit 31430 mg/kg et en manganèse (1390 mg/kg de boue sèche). Finalement, la boue de Sainte Claire (SCS) contient les plus hautes teneurs en cadmium, plomb et zinc avec 7.5, 144 et 751 mg/kg, respectivement. Les teneurs les plus faibles pour l'aluminium (221 mg/kg), le chrome (4 mg/kg), le cuivre (18.5 mg/kg), le fer (219 mg/kg), le nickel (1 mg/kg) et le plomb (1 mg/kg) se présentent dans la boue secondaire du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers. La boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) présente les teneurs le plus faibles en cadmium (0.15 mg/kg), manganèse (30 mg/kg) et en zinc (22 mg/kg).

La présence de composés organiques dans les boues utilisées dans ces expériences n'a pas été évaluée parce que normalement ils sont en très faibles concentrations dans les boues (MENVIQ *et al.*, 1991; St-Yves et Beaulieu, 1988). Une évaluation sur les populations des microorganismes contenues dans les boues d'épuration ne semblait pas non plus nécessaire puisqu'elles étaient stérilisées avant d'être inoculées avec *B. thuringiensis*..

3.2 Discussion

Les résultats des analyses réalisées sur les boues d'épuration montrent qu'elles ont des caractéristiques différentes selon leur type et leur origine et qu'elles contiennent des éléments pouvant servir comme substrat pour la culture de *B. thuringiensis* comme l'azote, le carbone et des ions métalliques (Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} et Ca^{+2}) qui sont importants pour la croissance et la sporulation de la bactérie (Ejiofor et Okafor, 1989). Les expériences réalisées en utilisant des milieux de cultures de constitutions différentes ont montré que la composition de chaque milieu peut influencer la croissance, la

sporulation et production de la δ -endotoxine produit par *B. thuringiensis* (Dulmage, 1971). Donc, il faut espérer qu'en raison de leurs différentes caractéristiques ces boues d'épuration employées comme milieu de culture pour *B. thuringiensis* peuvent influencer la croissance et la sporulation de la bactérie, ce qui aura des repercussions sur le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus.



4. UTILISATION DE BOUES D'ÉPURATION COMME MILIEU DE CULTURE

Dulmage (1970a, 1971) a observé que le type de souche et le milieu de culture utilisés dans les fermentations de *B. thuringiensis* ont une influence sur l'activité entomotoxique des cristaux. Il a aussi trouvé qu'un même sérotype pouvait donner différents comptes de spores et niveaux d'entomotoxicité selon le milieu de culture et les conditions de fermentation employées. Donc, on espérait que les différences de composition des boues et la façon de les utiliser, auraient une influence sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis*.

4.1 Résultats

4.1.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration de différents types et origines

Pour évaluer la reproduction de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 en utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture alternatif, sept boues de différents types et origines ont été employées. Chaque boue a été utilisée sous trois conditions de préparation, c'est-à-dire, sans prétraitement, avec prétraitement (hydrolyse à l'acide sulfurique) et le surnageant seul des boues hydrolysées obtenu après centrifugation afin d'évaluer l'influence de la composition des boues sur la production de spores, du complexe spores-cristaux et sur son niveau entomotoxique.

Dans un premier temps, les boues de Valcartier (ValP), Black Lake (BLS), Black Lake digérée aérobie (BLDA), Sainte Claire (SCS), Beauceville (BVS), la boue secondaire de l'usine de pâtes et papier (PPS) et celle du réacteur à membranes (PPRMS) ont été utilisées sans prétraitement. Elles ont été préparées selon ce qui est mentionné dans le point 2.3.1. et les conditions de culture employées décrites dans la section 2.4.

L'hydrolyse est un moyen facile qui permet de briser les grandes molécules de matière organique contenues dans les boues et de cette façon les rendre plus disponibles pour les microorganismes. Pour cette raison elle a été choisie comme prétraitement avant de faire l'inoculation de *B. thuringiensis* dans les sept boues déjà mentionnées. Les échantillons ont été préparés selon ce qui est décrit dans la section 2.3.2. et la fermentation a été réalisée en suivant ce qui est indiqué dans le point 2.4.

Une partie de la matière organique contenue dans les boues après avoir subi l'hydrolyse se trouve dans les surnageants obtenus après une centrifugation. Donc, il semblait intéressant d'évaluer la performance des surnageants pour l'obtention du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis*. Pour ce faire, les surnageants des sept boues citées ont été obtenus selon ce qui est décrit dans le point 2.3.3. et la fermentation a été réalisée selon ce qui est indiqué dans 2.4.

Sous les trois conditions d'utilisation des boues, des variations du pH ont été notées; les pH initial (avant l'inoculation) et final des expériences dans les différentes boues sont présentés dans le Tableau 4.1. Le pH dans les boues hydrolysées et les surnageants a été ajusté à 7 et il était utilisé comme pH initial des boues. Les valeurs du pH des boues ont augmenté pendant la fermentation pour arriver à une valeur finale entre 7.5 et 8.5 après la sporulation maximale (fin de l'expérience). La boue de Valcartier employée sans prétraitement n'a pas présenté cette variation pendant la culture de *B. thuringiensis*.

Tableau 4.1 pH final dans les boues d'épuration après la fermentation de *Bt*.

Échantillon	Non hydrolysée	Hydrolysée	Surnageant
Valcartier (ValP)	5.5 (5.5) ^a	8.0	8.0
Black Lake (BLS)	8.0 (6.5)	7.5	7.5
Black Lake digérée aérobie (BLDA)	7.5 (6.0)	7.5	8.0
Sainte Claire (SCS)	8.5 (7.0)	8.0	8.1
Beauceville (BVS)	8.5 (6.5)	8.0	8.0
Pâtes et papiers (PPS)	8.5 (6.5)	8.5	8.0
Pâtes et papiers (PPRMS)	8.0 (7.5)	8.0	8.0

^a Les valeurs entre parenthèses représentent le pH initial des boues employées dans les expériences. Dans les expériences des boues hydrolysées et des surnageants le pH initial était de 7.0.

La croissance de *B. thuringiensis* dans chacune des boues sous les trois conditions employées est décrite dans la Figure 4.1 A à N. La croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue secondaire non hydrolysée de Black Lake (BLS) est montrée dans les Figure 4.1 A et B. La phase de latence n'a pas été détectée dans le premier échantillonnage réalisé 24 heures après l'inoculation, ensuite la bactérie a commencé à se multiplier exponentiellement jusqu'au quatrième jour. Le complexe spores-cristaux a été recueilli le dixième jour (Figure 4.1 B), une fois la sporulation finale atteinte. Quand cette boue a été hydrolysée, la phase de latence était probablement si courte, qu'on ne l'a pas détectée après le premier échantillonnage, la phase de croissance exponentielle a continué jusqu'au premier jour et la sporulation maximale a été atteinte le huitième jour, au moment où le complexe spores-cristaux a été recueilli. Dans le surnageant de cette boue, la phase de latence de *B. thuringiensis* n'a pas été détectée, la croissance exponentielle a

continué jusqu'au premier jour et la fermentation a continué jusqu'au sixième jour quand le complexe spores-cristaux a été recueilli.

Les courbes de croissance et de sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue digérée aérobiquement de Black Lake (BLDA) apparaissent dans les Figures 4.1 C et 4.1 D. La phase de latence de la bactérie dans la boue non hydrolysée a pris un jour, ensuite la phase exponentielle a continué jusqu'au deuxième jour suivie de la lyse des cellules et la sporulation maximale a été atteinte entre le neuvième et dixième jour. La croissance de la bactérie dans la boue hydrolysée fut comme suit: la phase de latence s'est présentée avant le premier échantillonnage, la croissance exponentielle a continué jusqu'au deuxième jour et le complexe spores-cristaux a atteint la concentration maximale le huitième jour. Quand le surnageant de cette boue a été employé, la phase de latence n'a pas été détectée, la phase de croissance exponentielle a duré jusqu'au troisième jour et la fermentation a été arrêtée le quatrième jour une fois atteinte la sporulation maximale.

En utilisant la boue secondaire non hydrolysée de Sainte Claire (SCS) (Figures 4.1 E et F) la phase de latence n'a pas été détectée, la phase exponentielle a continué jusqu'au premier jour et la fermentation a été arrêtée le dixième jour, une fois la sporulation maximale atteinte. Dans la boue hydrolysée, encore la phase de latence n'a pas été détectée, la croissance exponentielle de la bactérie a continué jusqu'au premier jour et le complexe spores-cristaux a été recueilli le huitième jour. En utilisant le surnageant de cette boue, la phase de latence n'a pas été détectée non plus, la phase exponentielle de croissance a continué jusqu'au premier jour et le complexe spores-cristaux a été recueilli le cinquième jour.

L'utilisation de la boue de Beauceville (BVS) pour la croissance de *B. thuringiensis* (Figure 4.1 G et H) présente les caractéristiques suivantes: la phase de latence probablement était très courte et n'a pas été détectée, la phase exponentielle a continué jusqu'au premier jour et la sporulation maximale a été atteinte le onzième jour. En utilisant cette boue hydrolysée, la tendance de croissance de la bactérie a suivi le même

comportement que dans la boue sans hydrolyse, c'est-à-dire, que les temps de chaque étape sont les mêmes, sauf que la sporulation maximale a été atteinte le dixième jour. Dans le surnageant la croissance exponentielle de *B. thuringiensis* a continué jusqu'au troisième jour et la sporulation maximale a été atteinte le cinquième jour.

Dans la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) (Figure 4.1 I et J), la phase de latence n'a pas été détectée dans la boue non hydrolysée, ni dans la boue hydrolysée et le surnageant. La croissance exponentielle dans la boue non hydrolysée a continué jusqu'au deuxième jour et le complexe spores-cristaux a été recueilli le onzième jour (Figure 4.1 J). Dans la boue hydrolysée, la croissance exponentielle a continué jusqu'au premier jour et le complexe spores-cristaux a été recueilli le neuvième jour une fois la sporulation maximale atteinte. Dans le surnageant de cette boue, *B. thuringiensis* présente une croissance exponentielle jusqu'au deuxième jour et le complexe spores-cristaux est arrivé à sa concentration maximale le sixième jour.

B. thuringiensis présente une phase de latence dans la boue secondaire du réacteur en membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS) d'un jour (Figure 4.1 K), suivie de la phase exponentielle jusqu'au deuxième jour et la fermentation a été arrêtée le onzième jour (Figure 4.1 L). L'utilisation de la boue hydrolysée a réduit le période de la phase de latence, la croissance exponentielle a continué jusqu'au premier jour et le complexe spores-cristaux a atteint la concentration maximale le neuvième jour. Dans le surnageant de cette boue, la croissance de la bactérie a eu lieu comme suit: la phase exponentielle a continué jusqu'au troisième jour et la fermentation a été arrêtée le sixième jour une fois que la sporulation a été complétée.

La boue primaire de Valcartier comme telle (ValP) n'a pas été pas capable de soutenir la croissance de *B. thuringiensis*. La phase de latence a eu une durée de deux jours dans la boue hydrolysée et dans son surnageant. Une fois la boue hydrolysée, la bactérie a été capable de se développer dans ce milieu, la croissance exponentielle a continué jusqu'au quatrième jour (Figure 4.1 M) et la sporulation maximale a été atteinte le dixième jour

(Figure 4.1 N). Dans le surnageant de cette boue la croissance exponentielle a continué jusqu'au quatrième jour et le complexe spores cristaux a été recueilli le sixième jour une fois atteinte la sporulation maximale.

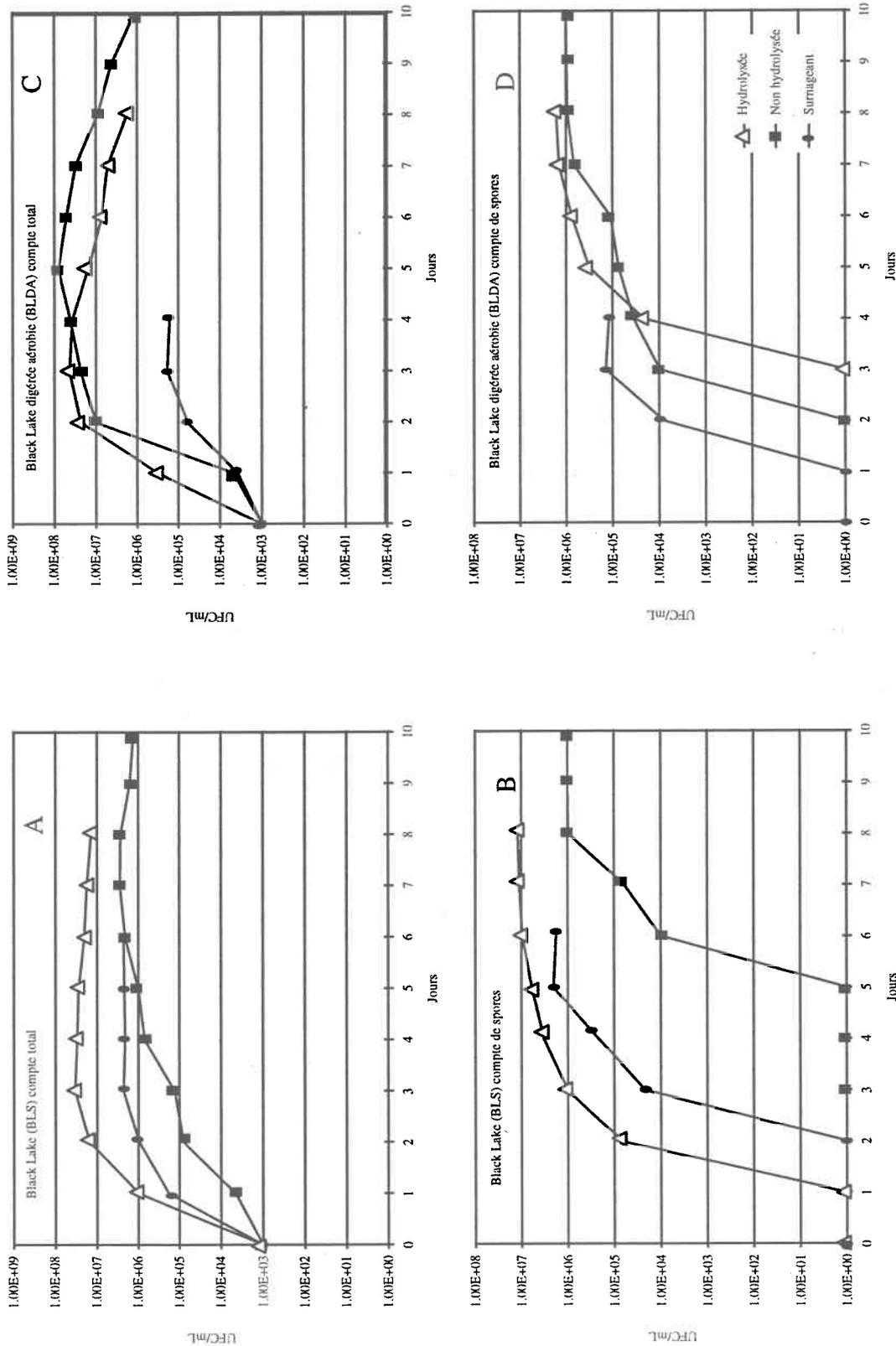


Figure 4.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration sous différents traitements.

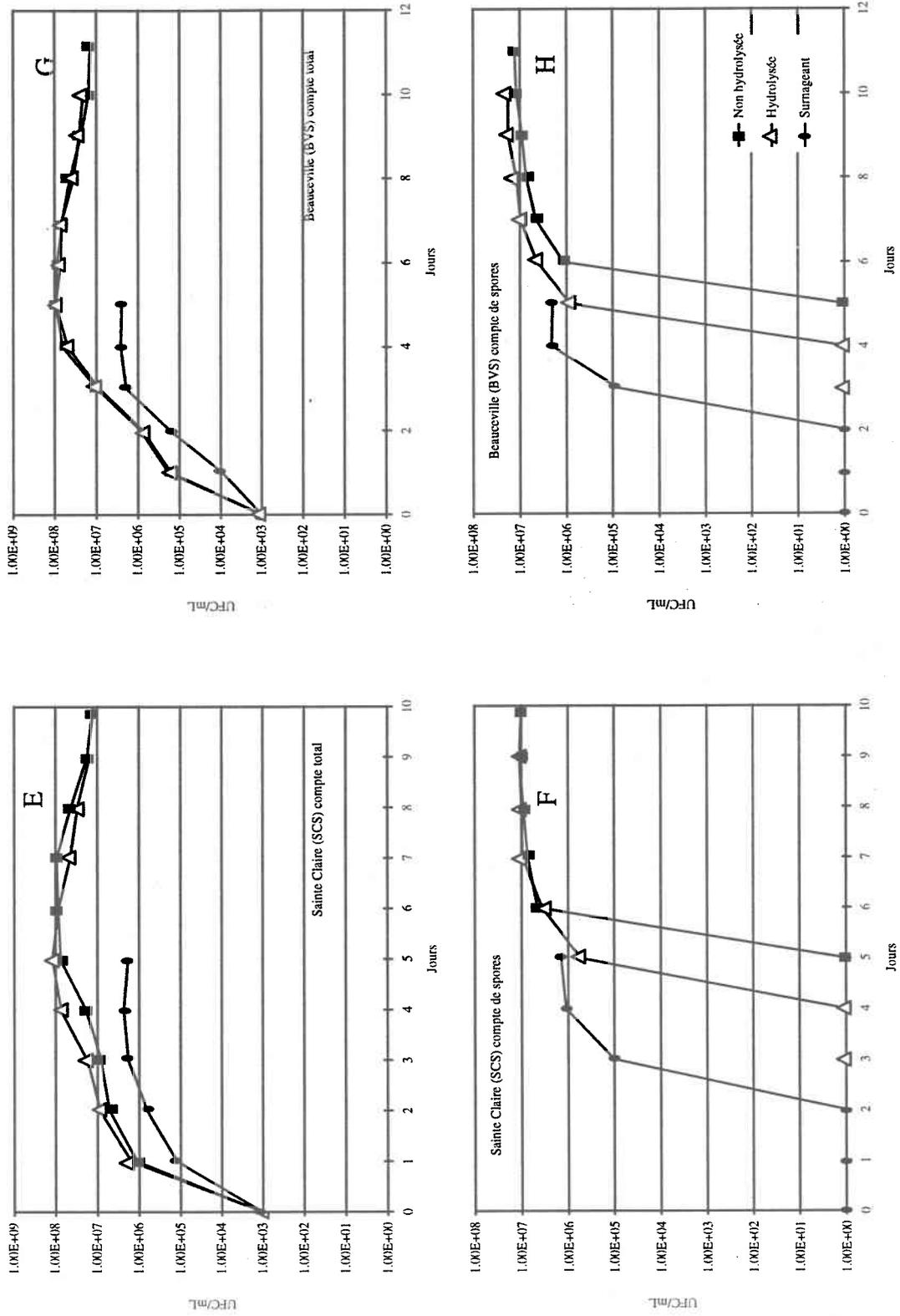


Figure 4.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration sous différents traitements.

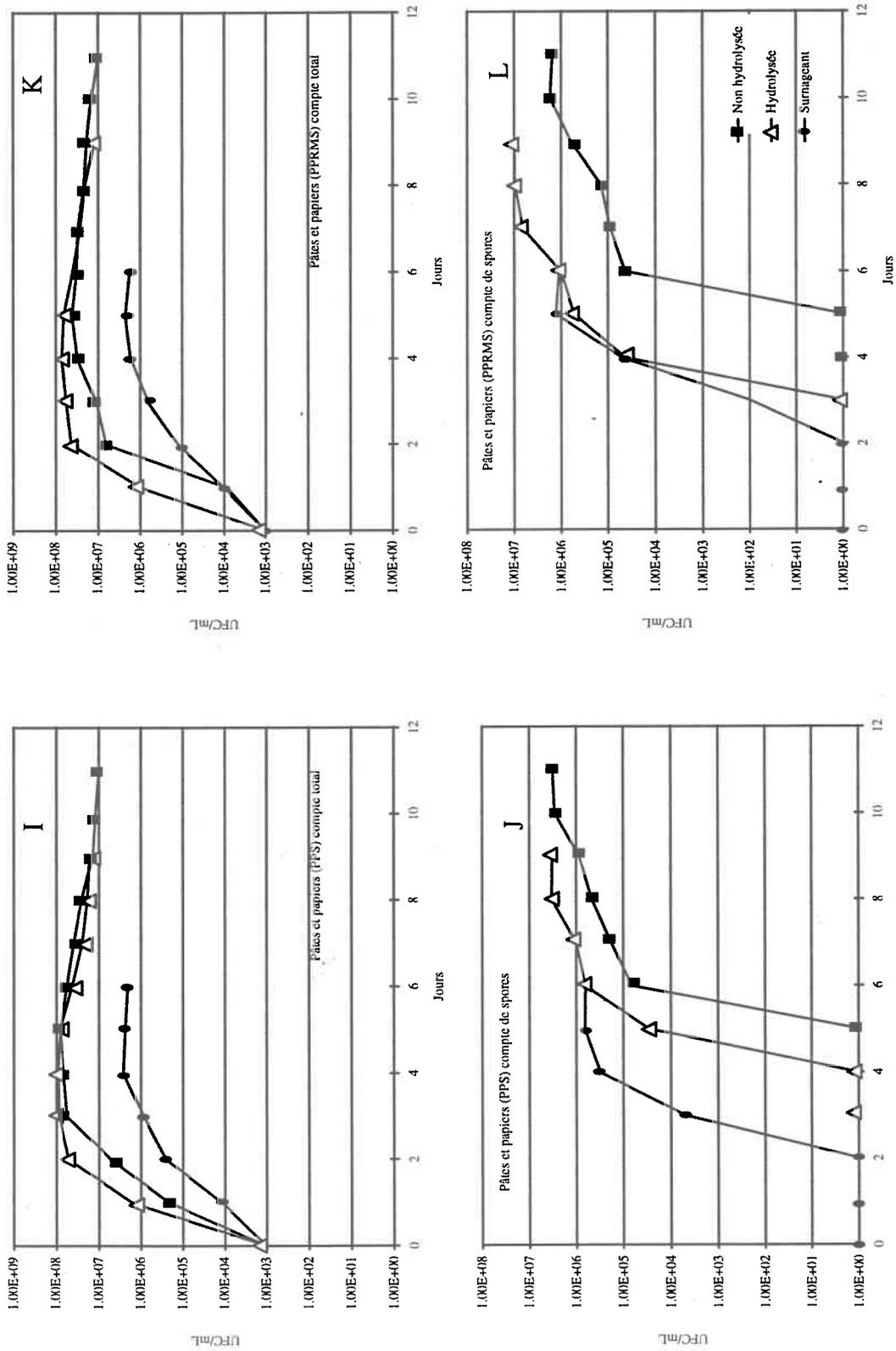


Figure 4.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration sous différents traitements.

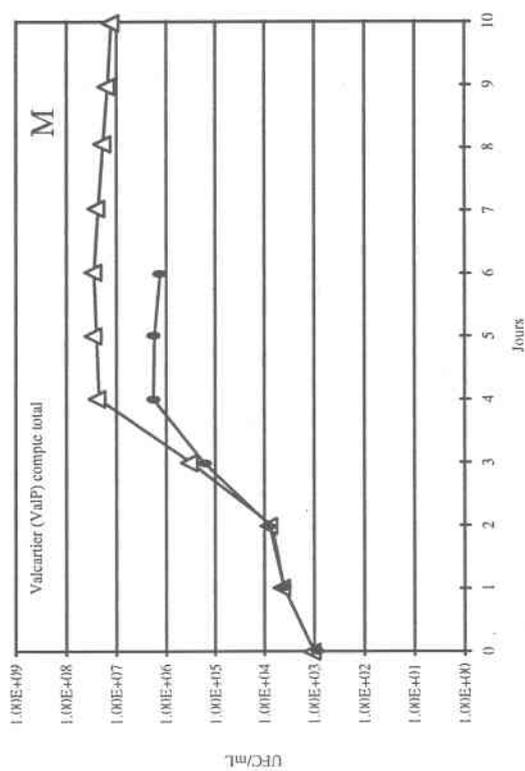
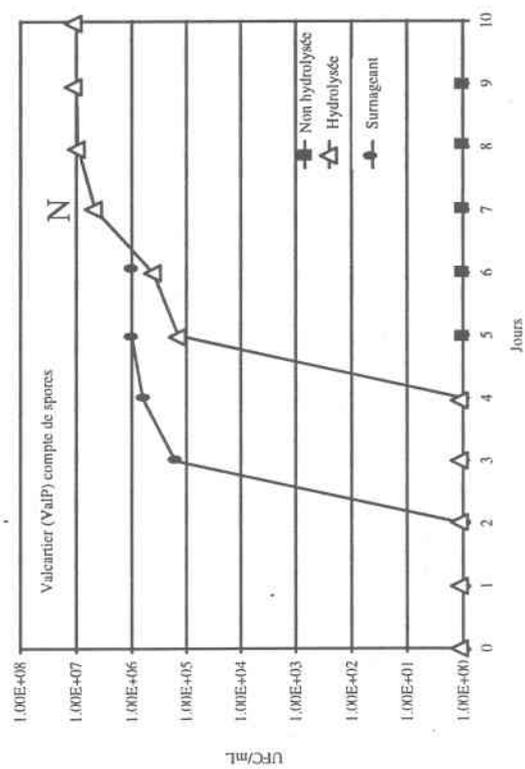


Figure 4.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration sous différents traitements.

Le Tableau 4.2 décrit les résultats de la numération totale finale viable (compte total viable) pour les sept boues. Dans le cas des boues non hydrolysées, ce sont les boues de Black Lake (BLS) et Black Lake digérée aérobiquement (BLDA) qui présentent les comptes totaux finaux les plus faibles (1.3×10^6 et 1.1×10^6 UFC/mL, respectivement). Les comptes totaux finaux dans les autres boues varient entre 1.0×10^7 et 1.2×10^7 UFC/mL, ce qui ne représente pas une grande différence par rapport à la concentration finale la plus élevée qui est de 1.4×10^7 UFC/mL avec la boue de Beauceville (BVS).

Une fois les boues hydrolysées, les comptes totaux finaux de *B. thuringiensis* ont augmenté dans toutes les boues par rapport aux comptes totaux finaux dans les boues sans prétraitement. La boue de Beauceville (BVS) a permis la concentration la plus haute avec 2.0×10^7 UFC/mL et c'est la boue digérée aérobiquement de Black Lake (BLDA) qui présente la concentration la plus faible (1.7×10^6 UFC/mL). L'augmentation dans le compte total viable de la boue secondaire de Black Lake (BLS) est la plus significative puisqu'elle est d'un ordre de magnitude, ce qui n'est pas le cas avec les autres boues où l'augmentation n'a pas été si considérable. La boue primaire de Valcartier (ValP) comme telle (non hydrolysée) n'est pas capable de soutenir la croissance de la bactérie, mais quand son pH initial a été ajusté pendant le processus d'hydrolyse, cette boue a été capable de soutenir la croissance de la *B. thuringiensis* dans un niveau comparable aux autres boues (1.3×10^7 UFC/mL).

Dans les surnageants des boues, c'est celui de la boue de Black Lake digérée aérobie (BLDA) qui présente les valeurs les plus basses du compte total final viable (1.6×10^5 UFC/mL). C'est le surnageant de la boue de Beauceville (BVS) qui permet la concentration la plus haute du compte total final viable (2.4×10^6 UFC/mL). Il faut mentionner que l'utilisation des surnageants a fait diminuer d'un ordre de magnitude les comptes totaux finaux viables dans toutes les boues (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 Croissance de Bt (compte total viable, UFC/mL) dans les boues d'épuration.

Échantillon	Non hydrolysée	Temps (jours)	Hydrolysée	Temps (jours)	Surnageant	Temps (jours)
Valcartier (ValP)	n.d. ^a	n.d. ^a	1.3×10^7	10	1.3×10^6	6
Black Lake (BLS)	1.3×10^6	10	1.4×10^7	8	2.3×10^6	6
Black Lake digérée aérobie (BLDA)	1.1×10^6	10	1.7×10^6	8	1.6×10^5	4
Sainte Claire (SCS)	1.2×10^7	10	1.5×10^7	9	1.8×10^6	5
Beauceville (BVS)	1.4×10^7	11	2.0×10^7	10	2.4×10^6	5
Pâtes et papiers (PPS)	1.0×10^7	11	1.6×10^7	9	2.0×10^6	6
Pâtes et papiers (PPRMS)	1.0×10^7	11	1.2×10^7	9	1.7×10^6	6

^a n.d.= non détecté

La numération totale dans le milieu de référence (farine de soja) était de 2×10^8 UFC/mL et la période de fermentation de 4 jours.

Les comptes finaux de spores et les pourcentages de sporulation de *B. thuringiensis* par rapport aux comptes totaux finaux dans les boues d'épuration sont présentés au Tableau 4.3. Parmi les boues non hydrolysées, ce sont les boues de Black Lake (BLS et BLDA) qui présentent les concentrations les plus faibles du complexe spores-cristaux (1×10^6 UFC/mL pour les deux) et c'est la boue de Beauceville (BVS) qui a permis la plus haute

concentration de spores (1.3×10^7 UFC/mL). Aucune spore n'a été détectée dans la boue de Valcartier (ValP) non hydrolysée.

En général, quand les boues ont subi le prétraitement (hydrolyse), les comptes de spores ont augmenté dans toutes les boues. Le compte de spores viables a augmenté dans la boue de Black Lake (BLS) d'un ordre de magnitude (1.2×10^7 UFC/mL) par rapport à la concentration dans cette même boue non hydrolysée (1.0×10^6 UFC/mL), ce qui n'est pas le cas avec les autres boues hydrolysées, qui ont permis d'augmenter leur concentration mais pas en quantité aussi considérable que la boue de Black Lake (BLS). La boue de Beauceville (BVS) a permis la plus haute concentration du complexe spores-cristaux (1.8×10^7 UFC/mL) et c'est la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) qui présente la concentration de spores la plus faible (1.6×10^6 UFC/mL). La boue de Valcartier (ValP) une fois hydrolysée a permis un niveau de sporulation de *B. thuringiensis* comparable aux autres boues (Black Lake (BLS), Sainte Claire (SCS) avec 1.0×10^7 UFC/mL et même supérieur aux concentrations obtenues avec les boues de l'usine de pâtes et papiers (PPS et PPRMS) et avec la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA).

Comme l'utilisation des surnageants avait diminué les comptes totaux viables dans toutes les boues, en conséquence, les comptes de spores ont diminué aussi d'un ordre de magnitude, sauf dans le surnageant de la boue du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS). Ce sont les surnageants de la boue de Beauceville (BVS) et de Black Lake (BLS) qui ont permis les plus hautes concentrations de spores (2.0×10^6 UFC/mL et 1.8×10^6 UFC/mL, respectivement), la concentration la plus faible étant obtenue avec le surnageant de la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) soit 1.2×10^5 UFC/mL. Le surnageant de la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) présente aussi une faible concentration du complexe spores-cristaux avec 6.5×10^5 UFC/mL.

Quand les boues ont été utilisées sans prétraitement comme milieu de culture pour *B. thuringiensis*, celle de Beauceville (BVS) et de Black Lake digérée aérobie (BLDA) ont

présenté des pourcentages de sporulation supérieurs à 90%. Les deux boues de l'usine de pâtes et papiers (PPS et PPRMS) ont permis les pourcentages de sporulation les plus faibles, soit 31% dans la boue secondaire (PPS) et 15% dans la boue du réacteur à membranes (PPRMS).

Pour l'ensemble des boues hydrolysées, c'est la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) qui soutient le plus haut pourcentage de sporulation, soit 94%, à peu près la même valeur présentée quand elle n'a pas été hydrolysée (91%). Suit la boue de Beauceville (BVS) avec un pourcentage de sporulation de 90%, presque pareil à celui obtenu sans hydrolyse (92%). Le pourcentage de sporulation dans la boue de Black Lake (BLS) a augmenté (86%) par rapport au pourcentage quand la boue n'a pas été hydrolysée (77%). Dans les boues de Sainte Claire (SCS) et secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) les pourcentages de sporulation ont diminué, soit 73% et 20% par rapport aux pourcentages quand les boues ont été employées sans hydrolyse (83% et 31%, respectivement). Le pourcentage de sporulation dans la boue du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papier est passé de 15% sans hydrolyse à 82% avec l'hydrolyse. La boue de Valcartier (ValP) hydrolysée a permis un pourcentage de sporulation de *B. thuringiensis* de 77% ce qui est très acceptable en tenant compte que cette boue n'a pas permis la croissance de la bactérie quand elle a été employée sans prétraitement (hydrolyse).

Les pourcentages de sporulation de *B. thuringiensis* dans les surnageants des boues de Valcartier (ValP) et de Sainte Claire (SCS) est de 77%. Pour la boue de Valcartier (ValP) c'est la même valeur que celle obtenue avec la boue hydrolysée (77%). Le surnageant de la boue de Black Lake (BLS) a permis le même pourcentage de sporulation (86%) que celui obtenu avec la boue hydrolysée et c'est le pourcentage de sporulation le plus haut pour l'ensemble des surnageants des boues. Ce sont les surnageants des boues digérées aérobies de Black Lake (BLDA) et du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS) qui présentent un pourcentage de sporulation de *B. thuringiensis* plus faible que quand ils ont été hydrolysés (75% et 65%, respectivement). Finalement, le surnageant

de la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) a présenté un pourcentage de sporulation presque semblable à celui obtenu quand la boue n'a pas été hydrolysée (33%).

Tableau 4.3 Sporulation (nombre de spores viables) de Bt dans les boues d'épuration.

Échantillon	Non hydrolysée		Hydrolysée		Surnageant	
	UFC/mL	%	UFC/mL	%	UFC/mL	%
ValP	n.d. ^a	n.d. ^a	1.0×10^7	77	1.0×10^6	77
BLS	1.0×10^6	77	1.2×10^7	86	1.8×10^6	86
BLDA	1.0×10^6	91	1.6×10^6	94	1.2×10^5	75
SCS	1.0×10^7	83	1.1×10^7	73	1.4×10^6	77
BVS	1.3×10^7	92	1.8×10^7	90	2.0×10^6	83
PPS	3.1×10^6	31	3.2×10^6	20	6.3×10^5	33
PPRMS	1.5×10^6	15	9.9×10^6	82	1.1×10^6	65

^a n.d.= non détecté.

Le nombre de spores viables dans le milieu farine de soja était de 1.8×10^8 UFC/mL, le pourcentage de sporulation de 90% et 4 jours était le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale du complexe spores cristaux.

Les taux maximum spécifiques de croissance μ_{\max} , h⁻¹ et le temps de génération t_g , h de *B. thuringiensis* dans chacune de boues employées sous les différents traitements se trouvent dans le Tableau 4.4. Les valeurs ont été obtenues en prenant la dérivée de la courbe de croissance (Annexe G). Dans les cas de boues non hydrolysées, le μ_{\max} a été presque de la même valeur (0.21 heure⁻¹ et 0.22 heure⁻¹) pour les boues de Beauceville (BVS) et pâtes et papiers (PPS). La boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) présente la valeur la plus haute, soit 0.32 h⁻¹. La boue du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers

(PPRMS) présente un $\mu_{\max} = 0.28 \text{ h}^{-1}$ et la boue secondaire de Sainte Claire présente une valeur de 0.29 h^{-1} et c'est la boue secondaire de Black Lake (BLS) qui présente le taux le plus faible, soit 0.12 h^{-1} .

Dans le cas de boues hydrolysées, le taux maximum spécifique de croissance varie entre 0.30 h^{-1} pour la boue de Sainte Claire et la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers, jusqu'à 0.18 h^{-1} pour la boue primaire de Valcartier (ValP) le taux le plus bas. Pour les boues secondaires de Black Lake (BLS) et de l'usine de pâtes et papiers (PPS) les valeurs sont plus hautes qu'avec les boues non hydrolysées, soit 0.29 h^{-1} pour la première et 0.30 h^{-1} pour la deuxième boue. Pour la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) la valeur du taux de croissance a baissé par rapport à la valeur trouvée en utilisant la boue non hydrolysée (0.24 h^{-1}). Pour les boues de Sainte Claire (SCS), Beauceville (BVS) et du réacteur à membranes de l'usine de pâtes et papiers (PPRMS) les valeurs de μ_{\max} se sont maintenues presque les mêmes qu'en utilisant les mêmes boues sans hydrolyse. Le temps de génération pour la boue hydrolysée de Black Lake (BLS) s'est réduit à moins de la moitié (2.4 heures) par rapport au temps que présente cette boue non hydrolysée; la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS) présente une légère diminution par rapport au temps de cette boue non hydrolysée. Pour les autres boues, le temps de génération est resté presque dans les mêmes valeurs que celles obtenues avec les boues non hydrolysées, sauf pour la boue digérée de Black Lake (BLD) où il y a une augmentation (2.9 heures) par rapport au temps quand cette boue n'a pas été hydrolysée (2.1 heures).

L'utilisation des surnageants de boues hydrolysées a fait diminuer les valeurs du μ_{\max} dans toutes les boues par rapport aux valeurs trouvées avec les boues hydrolysées; les valeurs ont varié de 0.10 h^{-1} pour la boue de l'usine de pâte et papiers (PPRM) jusqu'à 0.23 h^{-1} pour la boue secondaire de Black Lake (BLS), la valeur la plus haute dans tous les surnageants des boues. Les temps de génération ont augmenté pour toutes les boues par rapport aux temps trouvés en utilisant les boues hydrolysées, ce qui représente un développement plus lent de *B. thuringiensis* sous ces conditions.

Tableau 4.4 Cinétique de croissance de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration sous les différents traitements.

Échantillon	Non hydrolysée		Hydrolysée		Surnageants	
	t_g h	μ_{max} h^{-1}	t_g h	μ_{max} h^{-1}	t_g h	μ_{max} h^{-1}
BLS	5.8	0.12	2.4	0.29	3	0.22
BLDA	2.1	0.32	2.9	0.24	5.8	0.12
SCS	2.4	0.29	2.3	0.30	3.5	0.20
BVS	3	0.21	3	0.22	5.8	0.12
PPS	3	0.22	2.3	0.30	5.3	0.13
PPRMS	2.5	0.28	2.4	0.29	7	0.10
ValP	n.d. ^a	n.d. ^a	3.8	0.18	5.3	0.13

n.d.^a = non déterminé

Pour le milieu de référence (farine de soja) les valeurs sont: $\mu_{max} = 0.41 h^{-1}$ et $t_g = 1.7 h$.

4.1.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration

La détermination du potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus à partir des boues d'épuration a été réalisée par des bioessais. La technique pour la préparation de la diète utilisée dans ces expériences est la technique de contamination de la surface telle que décrite dans la section 2.9.2.1. et les bioessais se sont déroulés selon ce qui est indiqué dans la méthodologie dans le point 2.9.3. La mortalité des larves a été choisie comme le paramètre permettant d'estimer l'efficacité des produits obtenus (Salama, 1983 b, c) et les potentiels entomotoxiques ont été estimés selon ce qui est décrit dans la section 2.9.3. Les potentiels entomotoxiques des boues sans prétraitement, avec prétraitement et leurs surnageants sont décrits dans le Tableau 4.5.

Quand les boues ont été utilisées sans hydrolyse, c'est la boue de Beauceville (BVS) qui a le compte de spores le plus haut (1.3×10^7 UFC/mL) présentant un potentiel entomotoxique de 3000 UI/ μ L, mais c'est avec la boue secondaire de Black Lake (BLS) avec un compte de spores de 1×10^6 UFC/mL, (soit 13 fois moins de spores que la boue de Beauceville (BVS)), que le produit a le niveau entomotoxique le plus élevé (3300 UI/ μ L).

Pour l'ensemble des boues hydrolysées, c'est encore la boue de Beauceville (BVS) qui présente le compte de spores le plus élevé (1.8×10^7 UFC/mL). Son niveau entomotoxique de 3200 UI/ μ L est très proche de celui présenté par la boue primaire de Valcartier (ValP) (3000 UI/ μ L), qui a une concentration de spores inférieure à celle de la boue de Beauceville (BVS), soit 1×10^7 UFC/mL. La boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) présente la concentration la plus faible de spores (1.6×10^6 UFC/mL), mais le niveau entomotoxique du produit obtenu (3600 UI/ μ L) est le deuxième plus élevé après celui de la boue secondaire de Black Lake (BLS) (4100 UI/ μ L). Même si la boue digérée aérobie hydrolysée de Black Lake (BLDA) a permis le plus haut pourcentage de sporulation (94%) et un très bon potentiel entomotoxique (3600 UI/ μ L), c'est la boue secondaire de Black Lake (BLS) qui permet encore la meilleure entomotoxicité du complexe spores-cristaux avec 4100 UI/ μ L, plus élevée que celle obtenue avec le milieu farine de soja (3800 UI/mL), soit 7% de plus.

L'utilisation des surnageants a fait diminuer le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus à partir des boues. Les pourcentages de réduction du potentiel des produits obtenus à partir des surnageants par rapport au potentiel obtenu à partir des boues hydrolysées sont: pour le surnageant de la boue de Valcartier (ValP) qui donne un potentiel entomotoxique de 1100 UI/ μ L, la réduction est de 63%; pour le surnageant de la boue secondaire de Black Lake (BLS) qui a produit des cristaux avec un potentiel de 2900 UI/ μ L de boue, la réduction est de 30%. Les cristaux obtenus à partir du surnageant de la boue digérée de Black Lake (BLS) qui ont un potentiel de 2700 UI/ μ L, présentent une réduction de 25%. Pour le surnageant de Sainte Claire (SCS) avec un potentiel de 2800 UI/ μ L, la réduction est de 8%; pour le surnageant de Beauceville (BVS) dont le

potentiel des cristaux est de 1000 UI/ μ L, la réduction est de 71%, une des plus élevée. Pour les surnageants des boues de l'usine de pâtes et papiers, les pourcentages de réduction du niveau entomotoxique sont 76% dans le surnageant de la boue secondaire (PPS) et 78% dans le surnageant de la boue du réacteur à membranes (PPRMS).

L'hydrolyse a permis d'améliorer la performance des boues de l'usine de pâtes et papiers (PPS et PPRM) et de la boue de Sainte Claire (SCS) qui dans ces expériences ont permis à *B. thuringiensis* de produire des cristaux avec un niveau d'entomotoxicité comparable aux autres boues. La boue de Valcartier (ValP) une fois hydrolysée a été capable de soutenir la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis* dans un niveau comparable à celui des autres boues.

Tableau 4.5 Potentiel entomotoxique des préparations de Bt obtenues à partir de boues d'épuration.

Échantillon	Non hydrolysée	Hydrolysée	
		UI/ μ L	Surnageant
Valcartier (ValP)	n.d. ^a	3000	1100
Black Lake (BLS)	3300	4100	3000
Black Lake digérée (BLDA)	3000	3600	2700
Sainte Claire (SCS)	1300	3000	2800
Beauceville (BVS)	3000	3200	1000
Pâtes et papiers (PPS)	900	3200	900
Pâtes et papiers (PPRMS)	1300	3500	1200

^a n.d.= non déterminé

Le milieu farine de soja a présenté un potentiel entomotoxique de 3800 UI/ μ L.

Pour déterminer s'il existait une relation entre la sporulation et l'activité entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus à partir des boues, des calculs ont été faits pour obtenir l'indice d'activité par rapport au compte de spores (UI/10³ spores), cet indice a déjà été utilisé par Dulmage (1971). Le niveau d'activité relative au niveau de sporulation atteint est différent pour chacune des boues comme il est montré dans le Tableau 4.6.

Dans le groupe de boues non hydrolysées, la boue secondaire de Black Lake (BLS) présente l'indice d'activité relative le plus élevé, soit 3300 UI/10³ spores, tandis que l'indice d'activité le plus faible se présente dans la boue de Beauceville (BVS) avec 230 UI/10³ spores, soit 14 fois moins, mais leurs niveaux entomotoxiques sont très proches (3300 UI/μL pour la première boue et 3000 UI/μL pour Beauceville (BVS)), donc l'indice ne présente pas un bon rapport entre le niveaux de sporulation et l'entomotoxicité des complexes spores-cristaux si la comparaison se réalise entre les complexes spores-cristaux obtenus avec deux milieux de composition différente.

Dans l'ensemble des boues hydrolysées, l'indice d'activité relative par rapport à la concentration de spores était de 270 UI/10³ spores pour la boue hydrolysée de Sainte Claire (SCS), tandis que pour la boue primaire de Valcartier (ValP) elle était de 300 UI/10³ spores et le potentiel entomotoxique était pour les deux de 3000 UI/μL. Mais pour la boue digérée aérobie de Black Lake (BLDA) qui présente la concentration la plus faible de spores, soit 1.6x10⁶ UFC/mL, le niveau entomotoxique du produit obtenu est de 3600 UI/μL mais son rapport UI/spores est le plus élevé pour l'ensemble des boues hydrolysées, étant 2250 UI/10³ spores. Encore dans ces cas, l'indice d'activité relative ne permet pas d'établir un lien entre le niveau de sporulation et le potentiel entomotoxique des différents échantillons de boues hydrolysées.

Pour l'ensemble des surnageants, même si les comptes de spores de la boue de Beauceville (BVS) et de la boue secondaire de Black Lake sont très proches, soit 2x10⁶ UFC/mL pour la première et 1.8x10⁶ UFC/mL pour la deuxième, la boue de Beauceville présente un indice d'activité relative de 500 UI/10³ spores, tandis que celui de la boue de

Black Lake (BLS) est de $1700 \text{ UI}/10^3$ spores, soit 3.4 fois plus élevé que celui de Beauceville (BVS). Il n'est pas possible d'établir un lien entre l'entomotoxicité et le niveau de sporulation en utilisant l'indice d'activité relative.

Tableau 4.6 Indice d'activité relative des préparations de Bt obtenues à partir des boues d'épuration.

Échantillon	Non hydrolysée	Hydrolysée	Surnageant
	UI/10 ³ spores		
Valcartier (ValP)	n.d. ^a	300	1100
Black Lake (BLS)	3300	340	1700
Black Lake digérée (BLDA)	3000	2250	2250
Sainte Claire (SCS)	130	270	2000
Beauceville (BVS)	230	170	500
Pâtes et papiers (PPS)	290	1000	1380
Pâtes et papiers (PPRMS)	860	350	1100

^a n.d.= non déterminé.

L'indice d'activité relative du milieu farine de soja était de $12.6 \text{ UI}/10^3$ spores et celle du Foray 48B varie entre $0.2 \text{ UI}/10^3$ spores et $0.4 \text{ UI}/10^3$ spores.

4.2 Discussion

Dans ces expériences les variations trouvées dans le pH final des boues peuvent s'expliquer en tenant compte des différentes étapes de croissance de la bactérie. S'il n'existe pas un contrôle sur le pH dans le milieu de culture pendant la fermentation de *B. thuringiensis*, au début de la fermentation, le pH baisse à cause de la production des

acides par l'utilisation des hydrates de carbone jusqu'au début de la sporulation. Après, le pH commence à augmenter dans le milieu de culture dû à l'utilisation des acides pendant la sporulation et il peut atteindre 8.7 à la fin de cette étape (Abdel-Hameed *et al.*, 1991; Chilcott et Pillai, 1985; Dharmsthiti *et al.*, 1985). Les valeurs du pH final dans les boues se trouvent entre les valeurs rapportées dans toutes les cas de production de ce bioinsecticide quand il n'y a pas eu un contrôle sur ce paramètre pendant les fermentations réalisées avec divers milieux de culture et les valeurs varient selon les caractéristiques des milieux (Foda et Salama, 1986; Lee et Seleena, 1991; Obeta et Okafor, 1984; Pearson et Ward, 1988; Salama *et al.*, 1983a, b, c).

L'effet d'un pH bas sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* a été remarqué dans les expériences de Ejiofor et Okafor (1989), qui en utilisant différents milieux alternatifs n'ont pas trouvé de formation de cristaux et une très faible sporulation dans le milieu où le pH a été de 5.2. Ils ont conclu que c'était le pH qui a affecté la performance de la bactérie. Salama *et al.* (1983b) indiquent qu'un pH de 5.5 ou moins pourrait inhiber la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis*. Il a été établi que la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* peuvent être affectées si le pH du milieu de culture ne se trouve pas entre 6.5 et 7.5 (Abdel-Hameed *et al.*, 1991). Donc, il est probable que le pH initial de la boue de Valcartier (ValP) (pH=5.5) non hydrolysée ne soit pas approprié pour permettre le développement normal de la bactérie, limitant ainsi son utilisation comme milieu alternatif de culture si elle n'est pas soumise à un prétraitement.

La disponibilité des sources de carbone pour *B. thuringiensis* peut influencer le temps nécessaire pour arriver à la phase stationnaire et la production du complexe spores-cristaux (Black et Snyman, 1991). Cette condition pourrait expliquer les différences qui existent entre les temps de fin de la phase de sporulation de la bactérie dans les boues sous les différentes conditions d'utilisation.

Quand les boues ont été employées sans hydrolyse, le temps pour atteindre la sporulation maximale a été plus long (10 jours) que lorsque les boues ont été employées avec hydrolyse (entre 8 et 9 jours). Comme il a déjà été expliqué, l'hydrolyse a rendu une partie de la matière organique sous une forme plus facilement assimilable pour *B. thuringiensis* en réduisant le temps nécessaire pour la fermentation. Dans les boues non hydrolysées la matière organique se présente sous une forme moins assimilable pour la bactérie, donc la croissance a été plus lente. Black et Snyman (1991) signalent que les sources de carbone contenues dans le milieu de culture peuvent influencer le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire et la production des cristaux.

Dans les boues hydrolysées la matière organique se présente sous deux formes, soit solubilisée à cause de l'hydrolyse et en conséquence facilement assimilable pour la bactérie ou soit encore dans les solides, forme sous laquelle elle est consommée moins rapidement par *B. thuringiensis*, donc le temps pour arriver à la phase de sporulation maximale a été plus long qu'en utilisant les surnageants où toute la matière organique se trouvait en solution, ce qui la rend plus disponible pour *B. thuringiensis*, mais dans une moindre quantité que dans les boues hydrolysées.

Comme il a été expliqué l'utilisation des surnageants a diminué le temps pour atteindre la sporulation maximale (entre quatre et six jours) par rapport aux boues hydrolysées, mais la matière organique contenue dans les solides de boues hydrolysées encore utilisable pour *B. thuringiensis* ne se trouve pas dans les surnageants, donc il est probable que cette différence ait influencé le rendement dans la production de cellules, du complexe spores-cristaux et en conséquence le potentiel entomotoxique des surnageants qui sont plus faibles par rapport aux niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux obtenus en utilisant les boues hydrolysées. La quantité de substrat pour la croissance de *B. thuringiensis* était probablement en moindre quantité dans les surnageants, ce qui a réduit le temps de la fermentation par rapport aux boues hydrolysées ou non hydrolysées.

Le taux maximum spécifique de croissance (μ_{\max} , h^{-1}) de *B. thuringiensis* dans les boues hydrolysées de Black Lake (BLS) et les boues de l'usine de pâte et papiers (PPS) (PPRMS) est plus haut que dans les mêmes boues non hydrolysées. Probablement, comme il a déjà été mentionné, les éléments nutritifs contenus dans ces boues après l'hydrolyse se sont trouvés sous une forme plus facilement assimilable pour la bactérie, ce qui a permis une croissance plus rapide. L'utilisation des surnageants a fait diminuer les valeurs du taux maximum spécifique de croissance de la bactérie par rapport aux valeurs trouvées dans les boues hydrolysées, *B. thuringiensis* s'est développé plus lentement dans les surnageants.

Les différences de composition que peuvent présenter les milieux de culture influencent l'activité entomotoxique des produits de *B. thuringiensis* (Obeta et Okafor, 1984). Les variations trouvées dans les niveaux de production de spores et cristaux ainsi que dans l'entomotoxicité de cultures de *B. thuringiensis* obtenues en utilisant les boues d'épuration est une situation normale, étant donné les différentes caractéristiques de chacune d'elles. Dulmage (1970b) a conclu après avoir réalisé des expériences avec deux milieux de culture différents, que leur composition peut influencer la production de la δ -endotoxine, mais qu'il n'est pas possible de prédire cette influence sur le niveau entomotoxique. Il affirme que la quantité de δ -endotoxine produite dans des fermentations ne peut être estimée à partir de la souche employée, du niveau de croissance et de sporulation atteints ou du milieu de culture utilisée. En effet, le même chercheur en réalisant des expériences avec *B. thuringiensis* HD-1 var. *kurstaki* a trouvé que le niveau entomotoxique des produits obtenus ont varié entre 23,000 UI/mg et 11,000 UI/mg selon le milieu de culture employé (Dulmage, 1970b). Il mentionne que la production de la δ -endotoxine produite par *B. thuringiensis* doit être envisagée principalement comme un problème de fermentation étant donné que le niveau entomotoxique des cristaux produits par *B. thuringiensis* dépend de la souche et des conditions de la fermentation. Ceci est un point important car si la production de l'entomotoxine est un problème de fermentation, il serait possible d'obtenir des niveaux

entomotoxiques accrus en utilisant des milieux de culture qui favorisent la production de la δ -endotoxine sous les conditions de culture les plus favorables.

La littérature rapporte des valeurs de comptes de spores qui varient entre 2.1×10^5 spores/mL en faisant la culture de *B. thuringiensis* dans des erlenmeyers (Dharmstithi *et al.*, 1985) jusqu'à 3.2×10^{11} spores/mL dans un fermenteur (Ejiofor et Okafor, 1991). Les résultats des comptes de spores parmi les boues non hydrolysées, hydrolysées et leurs surnageants sont très variables. Il n'est pas possible d'établir un lien entre le niveau de sporulation et le niveau entomotoxique puisque tous les milieux de culture sont différents et ils ont été soumis aux conditions de préparation et de culture différentes. Des expériences faites avec différentes souches de *B. thuringiensis* cultivées dans deux milieux ont montré qu'il est possible de trouver un grand compte de spores mais une faible activité entomotoxique. Dans ces expériences les chercheurs ont conclu que certaines souches employées n'étaient pas de bonnes productrices de la δ -endotoxine dans les milieux de culture utilisés (Rogoff *et al.*, 1969).

Dans nos expériences, la souche a toujours été la même, *B. thuringiensis* HD-1, donc il est possible de conclure que ce sont la valeur nutritive du milieu de culture ou les conditions sous lesquelles il a été employé (boue sans hydrolyse, boue hydrolysée ou surnageant de la boue), qui ont influencé la qualité de la δ -endotoxine quand les comptes de spores ont été élevés. Des exemples montrant que dans certains cas c'est le milieu de culture qui a affecté la qualité de la δ -endotoxine se présentent en comparant la boue non hydrolysée de Sainte Claire (SCS) où le compte de spores est haut (1×10^7 UFC/mL) mais le niveau d'activité entomotoxique (1330/ μ L) est faible par rapport à celui des autres boues hydrolysées. La même situation se présente en comparant les performances de la boue secondaire non hydrolysée de l'usine de pâtes et papiers (PPS) et de la boue secondaire non hydrolysée de Black Lake (BLS). Les résultats montrent que la première boue (PPS) a permis un niveau de sporulation de 3.1×10^6 UFC/mL, avec une entomotoxicité de 900UI/ μ L, tandis que la deuxième (BLS) présente un niveau de sporulation beaucoup plus faible (1×10^6 UFC/mL) mais un niveau d'entomotoxicité plus

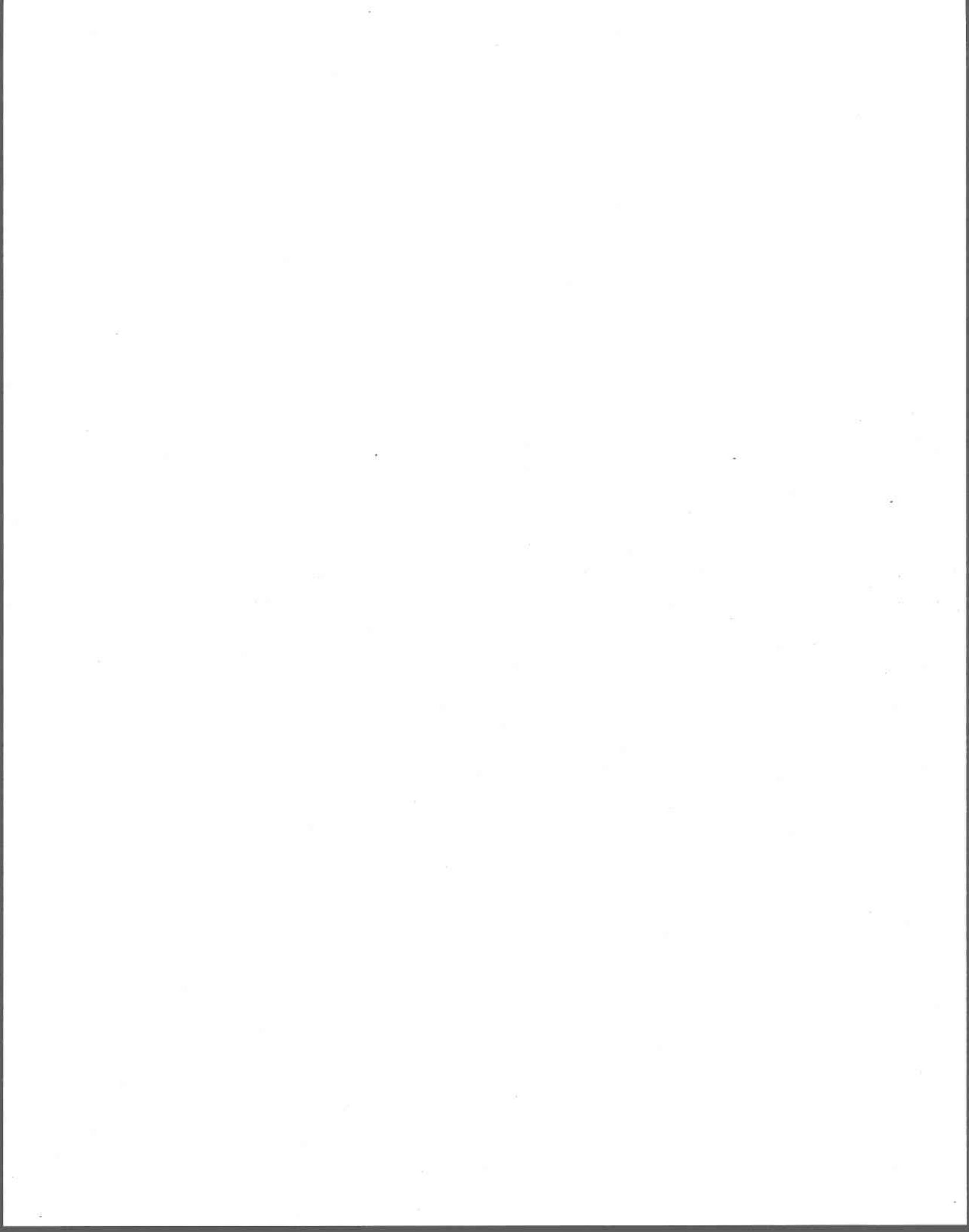
haut (3300×10^3 UI/mL) que celui de la boue secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS). Un comportement similaire (grand compte de spores et faible niveau entomotoxique) est signalé par Mummigatti et Raghunathan (1990) dans les cultures qu'ils ont obtenues en utilisant *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* cultivé dans six milieux de composition différente et pour la var. *kurstaki* HD-1 cette situation s'est présentée en utilisant un milieu synthétique additionné de graines des légumineuses (Salama *et al.*, 1983b).

La façon d'utiliser les boues a eu aussi une influence sur les niveaux de production de la δ -endotoxine. La boue non hydrolysée de Sainte Claire (SCS) a présenté un compte de spores de 1×10^7 UFC/mL et un niveau entomotoxique de 1300×10^3 UI/mL, mais quand son surnageant a été employé pour la culture de *B. thuringiensis*, le compte de spores était de 1.4×10^6 UFC/mL, et son activité entomotoxique était plus haute, soit 2800×10^3 UI/mL. Le traitement donné aux milieux de cultures peut donc influencer aussi la qualité de la δ -endotoxine produite par *B. thuringiensis*. D'après les résultats, l'utilisation des surnageants n'est pas recommandable pour certaines des boues utilisées pour l'obtention du biopesticide *B. thuringiensis* et ce, en raison des faibles potentiels entomotoxiques rencontrés par rapport à l'utilisation des boues après prétraitement par l'hydrolyse.

L'utilisation de l'indice d'activité relative, UI/ 10^3 spores, ne s'avère pas très concluant pour expliquer les performances des boues utilisées dans ces expériences pour l'obtention du bioinsecticide *B. thuringiensis* en raison du manque de rapport entre le niveau entomotoxique des produits obtenus et leur niveaux de sporulation. Par exemple, dans le cas de la boue digérée aérobiquement de Black Lake (BLDA) cet indice est le même pour les produits obtenus avec la boue hydrolysée et son surnageant, soit 2250 UI/ 10^3 spores dans les deux cas. Mais le niveau entomotoxique (UI/ μ L) est 1.3 fois plus grand dans le produit obtenu avec la boue hydrolysée qu'avec le surnageant de cette boue. La même conclusion peut être obtenue en comparant les indices de la boue secondaire non hydrolysée de l'usine de pâtes et papiers (PPS) avec son surnageant. Dans ce cas, les niveaux d'entomotoxicité des produits sont les mêmes (900 UI/ μ L), mais l'indice

UI/spores diffère amplement, il est de 290 UI/10³ spores pour la boue non hydrolysée, tandis que pour le surnageant il est de 1380 UI/10³ spores. Les résultats de ces expériences corroborent le fait déjà indiqué dans la littérature, qu'il n'est pas possible de prédire le potentiel du complexe spores-cristaux à partir du compte de spores, car des milieux de culture de composition différente ont une influence sur l'entomotoxicité des cristaux (Rogoff *et al.*, 1970; Dulmage, 1970; Dulmage et Rhodes, 1971; Abdel-Hameed *et al.*, 1990). Il n'est pas possible de conclure, en comparant les comptes de spores dans deux milieux de culture différents, du niveau d'entomotoxicité des complexes spores-cristaux obtenus, parce que ce paramètre ne permet pas d'évaluer la qualité des cristaux obtenus dans chacun des milieux, seuls les bioessais permettent de l'estimer.

Quelques unes des boues employées n'ont pas donné de bons résultats au niveau de l'activité entomotoxique du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Cette situation ne signifie pas, qu'elles ne sont pas appropriées pour la culture de *B. thuringiensis*. Il serait convenable de réaliser des expériences en faisant la culture d'autres souches, parce qu'il a été indiqué qu'un milieu de culture peut parfois soutenir une bonne production du complexe spores-cristaux d'une certaine souche, tandis qu'il peut donner de mauvais résultats avec une autre (Salama *et al.*, 1983a,b,c).



5. INFLUENCE DU pH ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PRODUCTION DE *B. thuringiensis*

Du point de vue biosynthétique, les produits microbiens peuvent être classés en quatre groupes:

- a) ceux produits par les gènes, par exemple les protéines et les enzymes;
- b) les produits des différentes voies biosynthétiques, par exemple les métabolites primaires et secondaires;
- c) les produits finaux du métabolisme, tels que les alcools et les acides organiques;
- d) les produits obtenus des manipulations génétiques, par exemple des protéines non caractéristiques à l'espèce.

La formation d'un certain produit est liée avec la croissance du microorganisme et comme la croissance est influencée par les facteurs environnementaux, la formation des produits sera aussi influencée si ces facteurs varient. Les principaux facteurs pouvant influencer la formation d'un certain produit sont la composition du milieu de culture, le pH, la température, l'agitation et l'addition de certaines substances dans le milieu de culture (Meyer *et al.*, 1985)

Les expériences réalisées par différents chercheurs ont démontré que les conditions dans lesquelles se développent la fermentation de *B. thuringiensis* peuvent influencer sa croissance, sa sporulation et la production du complexe spores-cristaux (Abdel-Hameed *et al.*, 1991; Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Ejiofor, 1991; Gonzalez et Carlton, 1984; Smirnoff, 1963). Parmi les conditions qui jouent un rôle important dans la croissance de cette bactérie se trouvent le pH et la température. Abdel-Hameed *et al.* (1991) signalent une diminution dans la production de l'entomotoxine produite par *B. thuringiensis* quand le pH du milieu de culture n'a pas été contrôlé. Ce même groupe de chercheurs mentionne que la production de l'entomotoxine a été affectée par les différentes températures de fermentation qu'ils ont employées dans leurs expériences.

Pearson et Ward (1988) indiquent que la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* peuvent être augmentées en travaillant à des températures entre 28-32 °C.

L'influence de ces paramètres sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 en utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture a été évaluée par la réalisation des différentes expériences décrites dans la section 2.5. Dans un premier temps, pour évaluer l'effet de la température sur la culture de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration, une série d'expériences a été faite en faisant varier la température de fermentation entre 30 °C et 36 °C. Les échantillons de la boue de Jonquière ont été hydrolysés à différents pH afin de déterminer le niveau d'hydrolyse nécessaire pour atteindre la plus haute entomotoxicité des cristaux.

La deuxième expérience consistait à maintenir constant le pH pendant toute la fermentation à l'aide de solutions tampon et à évaluer son impact sur la croissance et le niveau d'entomotoxicité des cristaux obtenus. Le fait de maintenir un pH près de la neutralité favorise la croissance, la sporulation et le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* (Sikdar *et al.*, 1991; Abdel-Hameed *et al.*, 1991).

Une dernière expérience a été réalisée pour évaluer l'influence d'un choc thermique sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis*. Elle consistait à faire varier la température une fois atteinte la phase de croissance exponentielle de façon à promouvoir la sporulation de la bactérie.

5.1 Variation de la température et du pH d'hydrolyse

La boue secondaire d'origine municipale de Jonquière a été employée dans ces expériences comme milieu de culture pour la fermentation de *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1; cette boue a été choisie parce que dans des expériences précédentes réalisées au laboratoire de l'INRS-Eau, elle avait permis l'obtention d'un niveau

entomotoxique plus élevé du complexe spore-cristaux que celui des boues employées dans les expériences décrites dans le chapitre antérieur.

5.1.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis*

Les fermentations ont été réalisées en utilisant quatre températures différentes entre 30 °C et 36 °C. Les échantillons ont été préparés et incubés selon ce qui est décrit dans la section 2.5.1. La fermentation a continué jusqu'à l'obtention du complexe spores-cristaux dans chacun des échantillons et le pH final dans tous était de 8 une fois atteinte la sporulation maximale; mais ce changement dans la valeur du pH semble une situation qui se présente normalement dans les milieux de culture une fois atteinte la sporulation dans les expériences où le pH n'est pas contrôlé pendant la fermentation (Dulmage, 1970b; Obeta et Okafor, 1984; Salama *et al.*, 1983b; Abdel-Hameed *et al.*, 1991).

Après l'expérience réalisée à une température d'incubation, un autre groupe de quatre échantillons a été préparé de la même façon jusqu'à avoir fait les expériences avec les quatre températures sélectionnées. Le Tableau 5.1 montre les valeurs du compte total final viable (compte total, UFC/mL), du compte de spores (compte de spores, UFC/mL) de *B. thuringiensis* cultivé dans la boue de Jonquière, les pourcentages de sporulation (%) et les périodes de fermentation (jours) pour chacune de conditions de fermentation employées.

La croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière sous les différents traitements de pH et de température sont résumées dans les Figures 5.1 A à H. La croissance de la bactérie dans la boue de Jonquière à un pH=7 est la suivante (Figure 5.1 A): à 30 °C la phase de latence n'a pas été détectée, la croissance exponentielle de la bactérie a duré un jour et la croissance maximum était de 1.76×10^8 UFC/mL. À 32 °C la phase de latence a eu lieu avant le premier échantillonnage après l'inoculation (premier jour) et pour cette raison elle n'a pas été détectée, la phase de croissance exponentielle a duré un jour et la croissance maximale de *B. thuringiensis* a eu lieu le deuxième jour (2.9×10^8 UFC/mL). À 34 °C le graphique 5.1 A montre un faible développement de *B.*

thuringiensis à cette température: le compte au moment de l'inoculation au temps zéro était de 2.02×10^7 UFC/mL, la phase de croissance exponentielle a duré un jour mais avec une faible augmentation du compte total par rapport au compte initial (9.5×10^7 UFC/mL). À 36 °C la croissance de la bactérie était la plus faible pour toutes les températures employées à ce pH, la phase de croissance exponentielle n'a pas été détectée et le compte final au quatrième jour de la fermentation présentait presque la même valeur que celle déterminée au moment de l'inoculation (2×10^7 UFC/mL).

La Figure 5.1 C montre la croissance de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière aux différentes températures employées au pH=6. Les comptes initiaux de l'inoculum utilisé pour les quatre expériences étaient presque semblables comme l'indique la figure 5.1 C. Le profil de croissance de *B. thuringiensis* pour les quatre températures est très similaire, la phase de latence n'a pas été détectée pour les quatre échantillons, elle s'est présentée probablement avant le premier échantillonnage effectué 24 heures après l'inoculation. Dans les quatre échantillons, la phase exponentielle a duré d'un jour et la croissance maximum a été atteinte le deuxième jour après laquelle les comptes totaux ont commencé à diminuer. Le compte total final le plus élevé est obtenu à 32 °C (2.1×10^8 UFC/mL) suivi de celui à 30 °C (1×10^8 UFC/mL), ensuite le compte à 34 °C (6.4×10^7 UFC/mL) et le plus bas à 34 °C (5.8×10^7 UFC/mL).

Au pH=4 (Figure 5.1 E) et à 30 °C, *B. thuringiensis* présente une phase exponentielle de croissance qui a duré un jour, la croissance maximale a été atteinte le deuxième jour (2.74×10^8 UFC/mL) et le compte total final était de 1.03×10^8 UFC/mL. À 32 °C la croissance maximale a été atteinte le troisième jour (2×10^8 UFC/mL) et le compte final était le plus haut pour l'ensemble des températures (1.6×10^8 UFC/mL). À 34 °C la phase de latence n'a pas été détectée, le compte maximum a été atteint le deuxième jour (1.7×10^8 UFC/mL) pour ensuite commencer à descendre pour arriver au quatrième jour à 7.7×10^7 UFC/mL. À 36 °C la croissance maximum de *B. thuringiensis* est atteinte le troisième jour avec un compte total de 1.08×10^8 UFC/mL. Le compte final total à cette température était de 9.6×10^7 UFC/mL le quatrième jour.

Finalement, au pH=2 la phase de latence n'a pas été détectée au moment du premier échantillonnage pour les quatre températures (Figure 5.1 G) et la phase de croissance exponentielle a eu lieu pour les quatre échantillons pendant le premier jour. À 30 °C la croissance maximum a été atteinte le troisième jour avec un compte total de 1.7×10^8 UFC/mL. À 32 °C la croissance maximum a été atteinte le deuxième jour (1.92×10^8 UFC/mL). À 34 °C la croissance maximum était de 2.33×10^8 UFC/mL et ce, au troisième jour. Pour la température de 36 °C, la croissance maximum a été atteinte le deuxième jour avec un compte de 1.23×10^8 UFC/mL.

Les comptes finaux viables les plus élevés sont obtenus à 32 °C pour le pH=4 et le pH=6. Pour le pH=2 il s'obtient à 30 °C, mais même ici la différence entre la valeur à 32 °C (1.1×10^8 UFC/mL) et la valeur à 30 °C (1.5×10^8 UFC/mL) n'est pas très grande. Les comptes finaux viables pour les températures de 34 °C et 36 °C sont d'un ordre de magnitude plus bas que pour les températures de 30 °C et de 32 °C dans les quatre pH employés.

Le développement de la sporulation dans chacun des échantillons est montré dans les Figures 5.1 B, D, F, H. Pour le pH=2 le compte du complexe spores-cristaux le plus élevé a été obtenu à la température de 30 °C (1.1×10^8 UFC/mL) avec un pourcentage de sporulation par rapport au compte total final viable de 73%, suivi de celui à 32 °C (1.0×10^8 UFC/mL) avec un pourcentage de sporulation de 90%. À 34 °C le compte du complexe spores-cristaux est de 8.4×10^7 UFC/mL avec un pourcentage de sporulation de 85% et le plus bas est détecté à la température de 36 °C, soit 5.1×10^7 UFC/mL avec un pourcentage de sporulation de 58%.

Pour les expériences réalisées au pH=4 ce sont les échantillons traités à 30 °C et 32 °C qui présentent les pourcentages de sporulation les plus élevés, soit 88% pour les deux avec un compte du complexe spores-cristaux qui varie entre 9.1×10^7 UFC/mL pour l'échantillon traité à 30 °C et 1.4×10^7 UFC/mL pour celui traité à 32 °C. L'échantillon traité à 36 °C présente le pourcentage de sporulation le plus faible de toutes les expériences (49%) avec

un compte du complexe spores-cristaux de 4.7×10^7 UFC/mL. À 34 °C le pourcentage de sporulation était de 53%.

Parmi les échantillons traités au pH=6 c'est l'échantillon à 32 °C qui a permis la plus haute sporulation de *B. thuringiensis*, soit 90% avec un compte du complexe spores-cristaux de 1.9×10^8 UFC/mL et c'est à 34 °C que se présente le niveau de sporulation le plus faible pour l'ensemble des échantillons avec 51% et un compte de 3.3×10^7 UFC/mL.

Dans le groupe d'échantillons qui n'ont pas subi le prétraitement d'hydrolyse (pH original de l'échantillon, soit pH=7), c'est l'échantillon traité à la température de 32 °C qui a permis le plus haut niveau de sporulation de *B. thuringiensis* avec 94% et un compte du complexe spores-cristaux de 9.2×10^7 UFC/mL et c'est l'échantillon traité à la température de 36 °C qui présente le pourcentage de sporulation le plus bas avec 35% et un compte du complexe spores-cristaux de 7.0×10^6 UFC/mL, le plus faible de tous.

En analysant les résultats obtenus aux températures, il est évident qu'en général, les concentrations de spores et les pourcentages plus élevés de sporulation sont atteints aux températures de 30 °C et 32 °C. Tandis qu'entre les pH utilisés, c'est au pH=7 que les pourcentages de sporulation plus élevés sont atteints.

Tableau 5.1 Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.

pH d'hydrolyse	Température de culture (°C)	Compte total (UFC/mL)	Compte de spores (UFC/mL)	Pourcentage de sporulation (%)	Temps (jours)
2	30	1.5×10^8	1.1×10^7	73	4
	32	1.1×10^8	1.0×10^8	90	4
	34	9.8×10^7	8.4×10^7	85	4
	36	8.8×10^7	5.1×10^7	58	4
4	30	1.0×10^8	9.1×10^7	88	4
	32	1.6×10^8	1.4×10^8	88	4
	34	7.7×10^7	4.1×10^7	53	4
	36	9.6×10^7	4.7×10^7	49	4
6	30	1.0×10^8	6.8×10^7	68	4
	32	2.1×10^8	1.9×10^8	90	4
	34	6.4×10^7	3.3×10^7	51	4
	36	5.8×10^7	3.4×10^7	58	4
7	30	1.3×10^8	1.2×10^8	92	4
	32	9.8×10^7	9.2×10^7	94	4
	34	9.5×10^7	3.1×10^7	49	4
	36	2.0×10^7	7.0×10^6	35	4

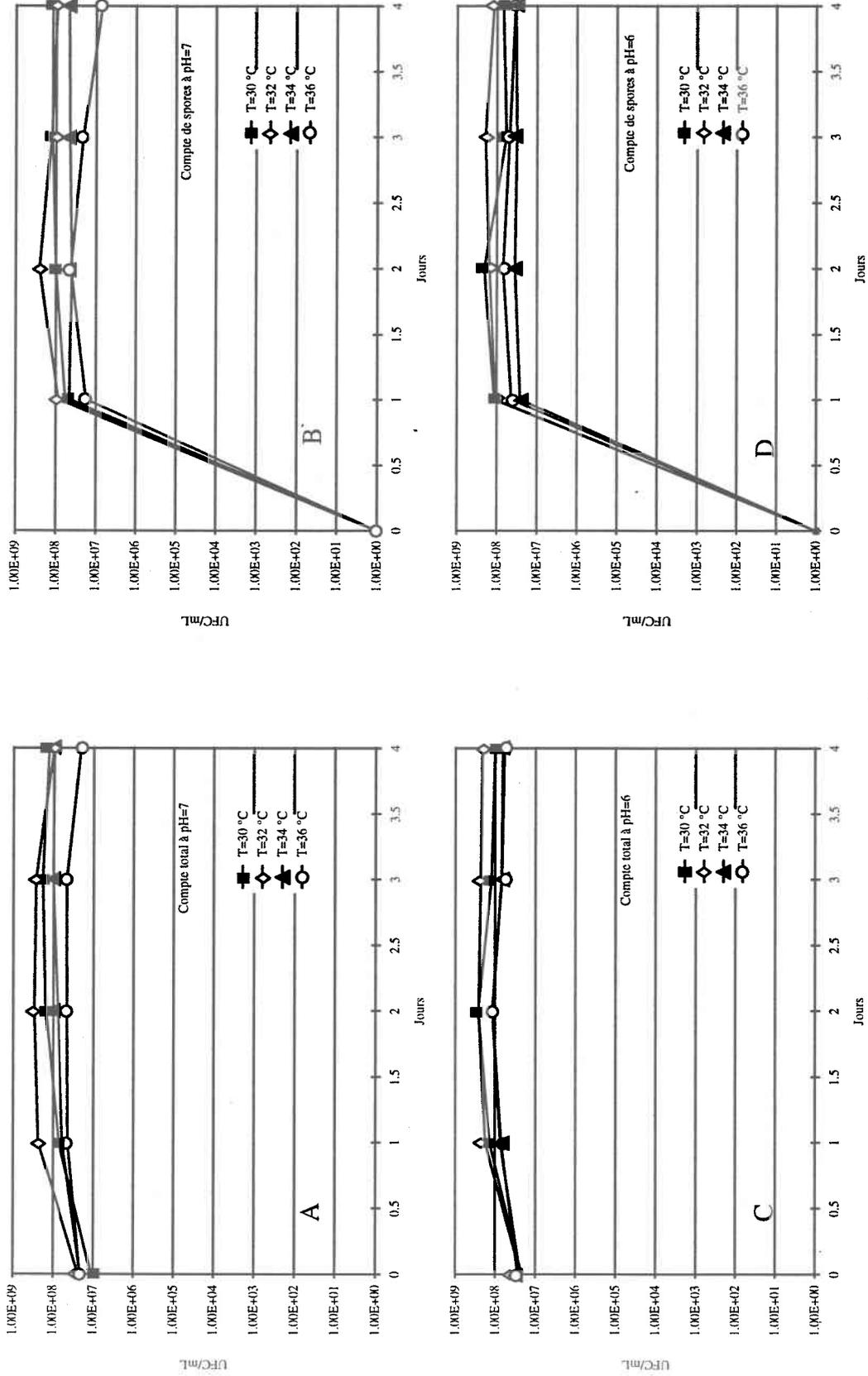


Figure 5.1 Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la production de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration.

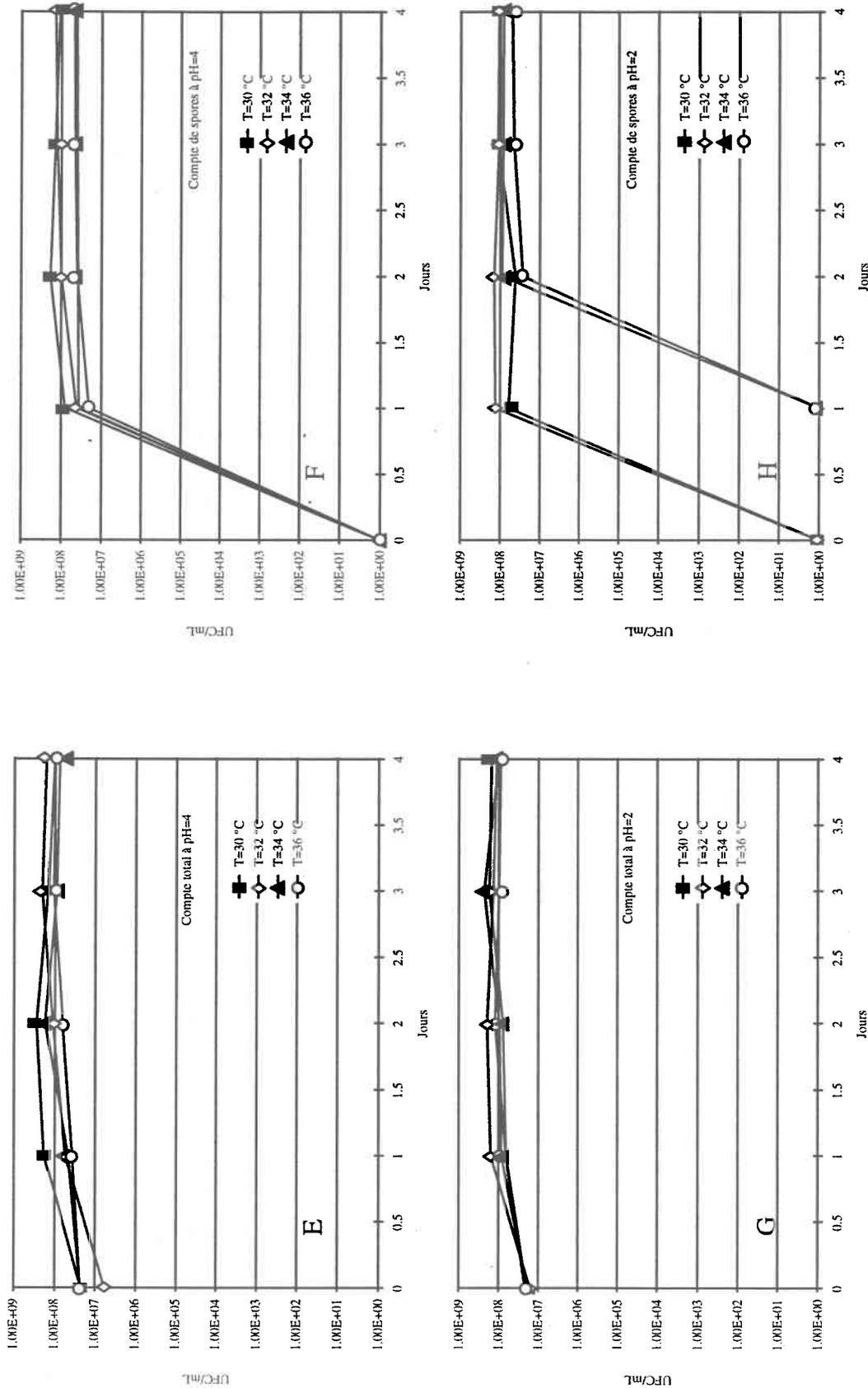


Figure 5.1 Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur la production de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration.

Afin de comparer la vitesse de croissance de *B. thuringiensis* sous chacun des pH d'hydrolyse et températures testés, le taux maximum spécifique de croissance μ_{\max} et les temps de génération (t_g) ont été calculés (Annexe H), les valeurs apparaissent dans le Tableau 5.2.

À pH=2, aux températures de 30 °C et 36 °C, le taux maximum spécifique de croissance de la bactérie est de 0.05 h⁻¹, pour le 34 °C la valeur est de 0.06 h⁻¹ tandis que c'est à 32 °C que *B. thuringiensis* s'est développé plus rapidement à ce pH d'hydrolyse puisque le taux de croissance a atteint la valeur de 0.1 h⁻¹.

À pH=4 le taux maximum spécifique de croissance présente la valeur la plus élevée pour les 30 °C et 32 °C, soit 0.09 h⁻¹. Pour 34 °C et 36 °C les valeurs présentent une diminution à mesure que la température augmente, elles sont de 0.05 h⁻¹ à 34 °C et de 0.02 h⁻¹ pour 36 °C.

À pH=6 pour 30 °C et 32 °C les valeurs du taux maximum spécifique de croissance sont très similaires (0.08 h⁻¹ et 0.09 h⁻¹, respectivement), le taux de croissance de *B. thuringiensis* à 34 °C présente la même valeur par rapport à la valeur au pH=4, soit 0.05 h⁻¹. Finalement, c'est à 36 °C que se présente le taux le plus faible, soit 0.04 h⁻¹.

À pH= 7 le taux maximum spécifique de croissance pour 30 °C est de 0.08 h⁻¹ tandis que pour 32 °C il est de 0.1 h⁻¹, la valeur la plus élevée dans les échantillons à ce pH. Pour 34 °C et 36 °C les valeurs diminuent pour atteindre respectivement 0.04 h⁻¹ et de 0.03 h⁻¹.

En analysant du point de vue des températures employées dans les fermentations, généralement les taux maximum de croissance les plus faibles se présentent à 34 °C et 36°C où la croissance de *B. thuringiensis* a été plus affectée par la température, surtout à 36 °C où les valeurs du taux maximum spécifique de croissance sont les plus faibles (entre 0.02 h⁻¹ et 0.05 h⁻¹).

Tableau 5.2 Cinétique de croissance de Bt dans la boue de Jonquière à différents pH d'hydrolyse et températures de fermentation.

pH d'hydrolyse	Température de culture (°C)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Temps de génération t_g (h)
2	30	0.05	13.8
	32	0.10	6.9
	34	0.06	11.5
	36	0.05	13.8
4	30	0.09	7.7
	32	0.09	7.7
	34	0.05	23
	36	0.02	34.5
6	30	0.08	8.6
	32	0.09	7.7
	34	0.05	13.8
	36	0.04	17.3
7	30	0.08	8.6
	32	0.10	6.9
	34	0.04	17.3
	36	0.03	23

Les pourcentages de sporulation présentent une certaine relation avec le taux spécifique de croissance. En général, il est possible d'établir que lorsque le taux de croissance présente une valeur élevée, le pourcentage de sporulation est aussi accru. Par exemple, dans les échantillons à pH = 2, celui qui a le taux le plus élevé, soit l'échantillon à 32 °C, présente un pourcentage de sporulation de 90%. Cette situation se répète dans les échantillons au pH=4 à 30 °C et 32 °C où les taux de croissance varient entre 0.9 h⁻¹ et

0.1 h⁻¹ et leur pourcentage de sporulation est de 88% pour les deux. À pH=6 c'est l'échantillon de 32 °C avec un taux de croissance spécifique de 0.09 h⁻¹ qui présente le pourcentage de sporulation le plus élevé pour l'ensemble des échantillons à ce pH, soit 90%. Finalement, à pH=7 c'est encore l'échantillon à 32 °C qui a le taux de croissance le plus élevé (soit 0.1 h⁻¹) qui présente un pourcentage de sporulation de 94%. Les pourcentages de sporulation les plus faibles sont obtenus surtout pour la température de 36 °C pour tous les pH utilisés et c'est à 32 °C que sont atteints les pourcentages de sporulation les plus élevés pour l'ensemble des échantillons aux différents pH testés.

En conclusion, il est possible d'établir qu'en travaillant avec la boue secondaire de Jonquière, il n'est pas nécessaire de réaliser l'hydrolyse de l'échantillon afin d'améliorer la performance de la boue pour l'obtention du complexe spores-cristaux, puisque quand la boue a été employée sans prétraitement (hydrolyse) le compte total, le pourcentage de sporulation et le taux maximum spécifique de croissance sont presque semblables aux résultats avec la boue hydrolysée au pH=2.

5.1.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux

Les bioessais ont été employés pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Jonquière sous différentes conditions de pH et de température. La préparation de la diète employée dans ces expériences a été faite selon la technique d'incorporation décrite dans 2.9.2.2 et les bioessais se sont déroulés selon ce qui est mentionné dans la section 2.9.3.

Les expériences faites ont démontré que les températures employées influencent le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu à différents pH d'hydrolyse. Le Tableau 5.3 montre les potentiels entomotoxiques (UI/μL) aux différentes températures et pH utilisés et l'indice d'activité relative par rapport au compte de spores (UI/10³ spores). En général, dans chacun des pH testés c'est à 34 °C et 36 °C que les indices d'activité relative plus élevés et les pourcentages de sporulation plus faibles sont

obtenus. Cette situation est due surtout au fait qu'avec ces températures s'observent les comptes de spores plus bas pour l'ensemble des échantillons. Avec le pH=2 c'est l'échantillon traité à 36 °C qui présente l'indice UI/10³ spores le plus élevé, soit 102 UI/10³ spores et le compte de spores le plus bas (5.1×10^7 UFC/mL) avec un pourcentage de sporulation de 58%.

À pH=4 l'indice d'activité relative le plus élevé correspond à l'échantillon de 34 °C (158 UI/10³ spores) qui a permis seulement un pourcentage de sporulation de 53% avec un compte de spores de 4.1×10^7 UFC/mL, suivi de l'échantillon à 36 °C (104 UI/10³ spores) avec un pourcentage de sporulation de 49% et un compte de spores de 4.7×10^7 UFC/mL.

À pH=6 se présente la même situation, les échantillons qui n'ont pas permis un bon pourcentage de sporulation sont les échantillons à 34 °C (51%) et à 36 °C (58%) ayant l'indice le plus élevé d'activité relative (121 UI/10³ spores et 103 UI/10³ spores, respectivement). Ici encore, les comptes de spores pour ces échantillons sont les plus faibles pour l'ensemble à ce pH, soit 3.3×10^7 UFC/mL et 3.4×10^7 UFC/mL.

Finalement, au pH=7 l'échantillon à 36 °C présente l'indice d'activité relative (585 UI/10³ spores), le compte de spores (7×10^6 UFC/mL) et le pourcentage de sporulation (35%) les plus faibles de tous les échantillons aux différents pH et températures. L'échantillon à 34 °C avec un indice de 187 UI/10³ spores présente un pourcentage de sporulation de 49% et un compte de spores de 3.1×10^7 UFC/mL. La Figure 5.2 montre la relation existant entre les comptes de spores (UFC/mL) des échantillons et leur indice d'activité relative (UI/10³ spores).

Tableau 5.3 Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur le potentiel entomotoxique des complexe spores-cristaux de Bt.

Échantillon		Potentiel entomotoxique (UI/ μ L)	Indice d'activité relative (UI/ 10^3 spores)
pH d'hydrolyse	Température de culture ($^{\circ}$ C)		
2	30	6000	54.5
	32	6300	63.0
	34	6600	78
	36	5200	102
4	30	5900	65
	32	4800	34
	34	6500	158
	36	4900	104
6	30	4750	70
	32	3600	19
	34	4000	121
	36	3500	103
7	30	5100	43
	32	7300	80
	34	5800	187
	36	4100	585

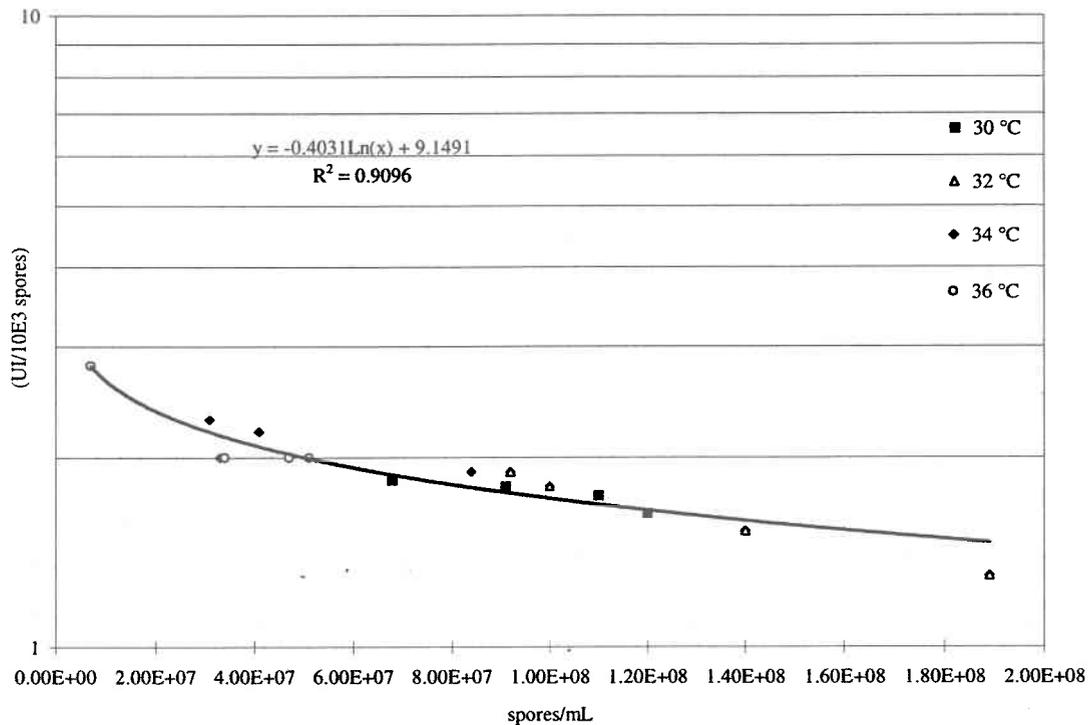


Figure 5.2 Influence du pH d'hydrolyse et de la température sur l'indice d'activité relative de sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.

Dans la Figure 5.2 il est possible de remarquer que les plus basses valeurs des comptes de spores correspondent à celles obtenues à 34 °C et 36 °C à tous les pH, sauf pour un point au pH=2 et 34 °C; les autres points sur la courbe correspondent aux comptes de spores obtenus aux températures de 30 °C et 32 °C pour tous les pH employés. Cette distribution des données sur la courbe indique que les températures qui favorisent la sporulation et en conséquence une plus grande quantité des cristaux entomotoxiques, en utilisant la boue secondaire de Jonquière, seraient 30 °C et 32 °C. Donc comme différents chercheurs l'ont indiqué, il est important en utilisant un milieu de culture de trouver les conditions de fermentation les plus favorables à la sporulation de la bactérie, ce qui aura une conséquence bénéfique au point de vue du niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux.

5.2 Influence du contrôle du pH pendant la fermentation

Pour maintenir le pH constant pendant la fermentation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière, deux solutions tampons ont été employées soit, le tampon TRIS et le tampon PBS. La performance de chacune a été évaluée en termes de croissance de *B. thuringiensis*, de pourcentage de sporulation et de niveau d'entomotoxicité atteint en comparant avec la boue sans solution tampon.

5.2.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis*

Les trois échantillons de la boue de Jonquière ont été préparés selon ce qui est expliqué dans la section 2.5.2. Les résultats des comptes totaux finaux viables, les comptes de spores, les pourcentages de sporulation et les taux maximum spécifiques de croissance μ_{\max} pour les trois échantillons sont présentés dans le Tableau 5.4. et dans les Figures 5.3 et 5.4 apparaissent les courbes de croissance et de sporulation de *B. thuringiensis* dans les trois échantillons. L'Annexe I contient les calculs pour déterminer le taux maximum spécifique de croissance.

La Figure 5.3 montre que pour l'échantillon sans tampon la phase de latence a duré douze heures, la phase exponentielle a continué jusqu'à 24 heures et la croissance maximale a été atteinte à 72 heures. Pour l'échantillon additionné avec le tampon PBS la phase de latence a eu une durée de neuf heures, la phase exponentielle a continué jusqu'à 18 heures et la fermentation a été arrêtée à 72 heures une fois le compte total maximum atteint. Pour l'échantillon contenant le tampon TRIS la phase de latence a duré six heures, la phase de croissance exponentielle a continué jusqu'à 27 heures et la croissance maximale a été atteinte à 72 heures.

La Figure 5.4 montre que pour la boue sans tampon, la sporulation a commencé à 18 heures, le pourcentage de sporulation à la fin de la fermentation a été de 80 % et le taux maximum spécifique de croissance de 0.08 h^{-1} (Tableau 5.4). Pour l'échantillon de la

boue qui contient le tampon PBS la sporulation a commencé à 21 heures avec une efficacité de sporulation de 90 % et un taux spécifique de croissance de 0.08 h^{-1} (Tableau 5.4). Finalement, dans l'échantillon de la boue additionnée du tampon TRIS, la sporulation a commencé à 24 heures avec un pourcentage final de sporulation de 94 % et un taux spécifique de croissance de 0.08 h^{-1} (Tableau 5.4).

Tableau 5.4 Influence du contrôle de pH pendant la fermentation de Bt dans la boue de Jonquière.

Échantillon	Compte total final	Compte de spores	Pourcentage de sporulation	μ_{\max}
	UFC/mL	UFC/mL	%	h^{-1}
Sans tampon	1.4×10^8	1.12×10^8	80	0.08
Avec PBS	1.34×10^8	1.21×10^8	90	0.08
Avec TRIS	1.42×10^8	1.34×10^8	94	0.08

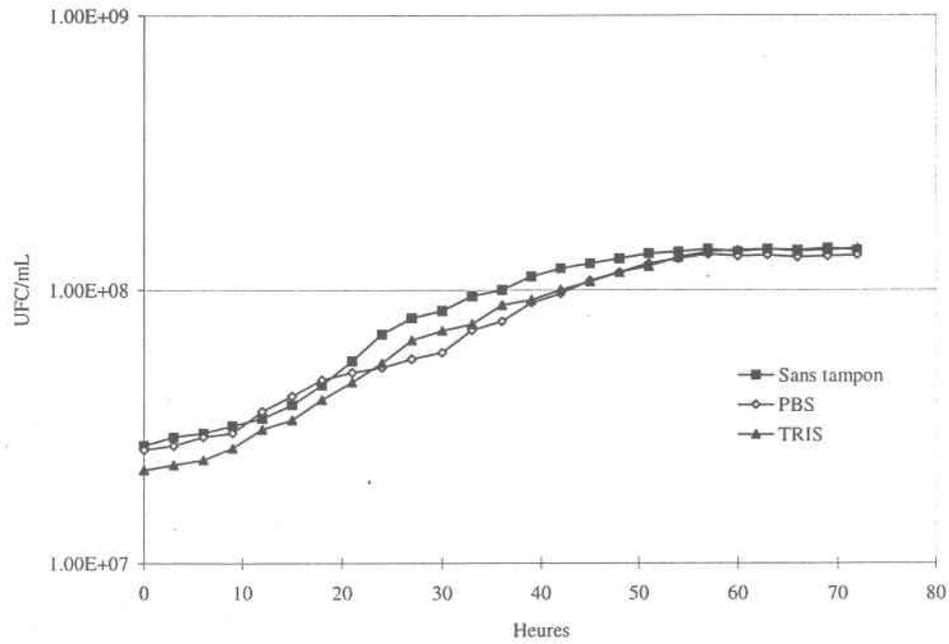


Figure 5.3 Influence du contrôle de pH sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.

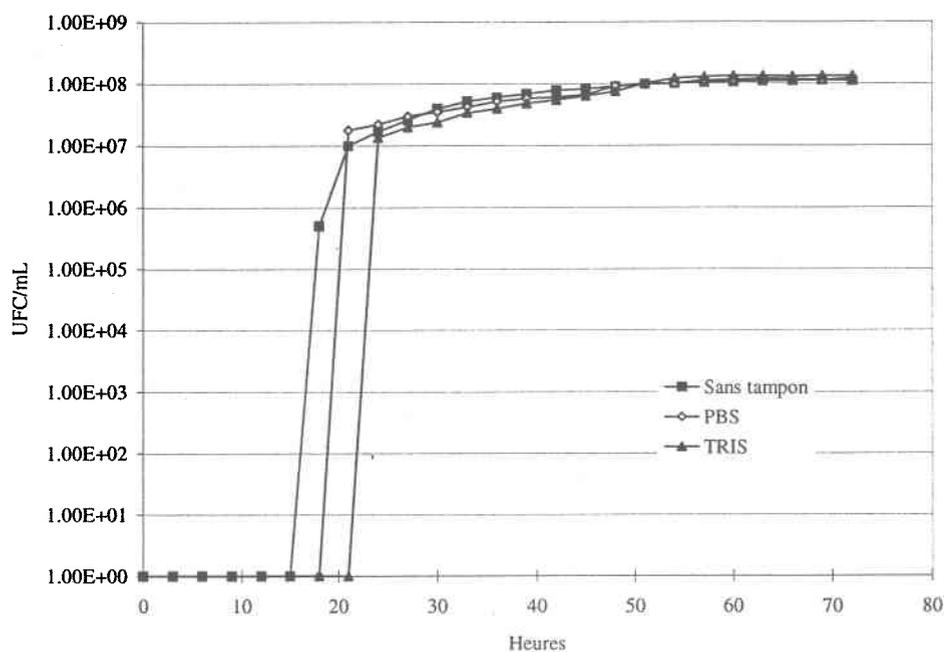


Figure 5.4 Influence du contrôle de pH sur la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.

5.2.2 Détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux

Pour la détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis*, les premières dilutions obtenues aux prélèvements effectués chaque trois heures pendant 72 heures ont été utilisées et la diète a été préparée suivant la technique d'incorporation décrite dans la section 2.9.2.2. et les bioessais se sont déroulés selon ce qui est indiqué dans la section 2.9.3. Les Figures 5.5, 5.6 et 5.7 montrent le développement du potentiel entomotoxique dans les trois échantillons employés. Après 63 heures le potentiel entomotoxique était semblable dans les échantillons et pour cette raison les graphiques présentent seulement les résultats jusqu'à cette heure.

Les trois figures mentionnées montrent que la toxicité augmente au fur et à mesure que les échantillons correspondent aux prélèvements des dernières heures, c'est -à- dire, que la toxicité la plus élevée a lieu une fois que la phase de croissance exponentielle a été atteinte. La plupart des cristaux ont été synthétisés pendant la phase de sporulation, mais une petite quantité a été aussi formée pendant la phase de croissance exponentielle, ce qui peut s'expliquer en tenant compte que les gènes codant pour la production des cristaux chez *B. thuringiensis* peuvent aussi s'exprimer pendant la phase exponentielle de croissance (Kanda, 1987).

Dans les trois cas, c'est après le prélèvement de 48 heures que le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux commence vraiment à augmenter d'une façon évidente et ce prélèvement correspond à peu près à l'heure où le compte total commence à devenir stable dans les trois milieux de culture. En tenant compte de ce fait, il serait recommandable pour la production à grande échelle d'arrêter la fermentation dans les 57 à 60 heures puisque les toxicités maximales sont déjà atteintes. Au moins pour cette boue ceci semble être le cas.

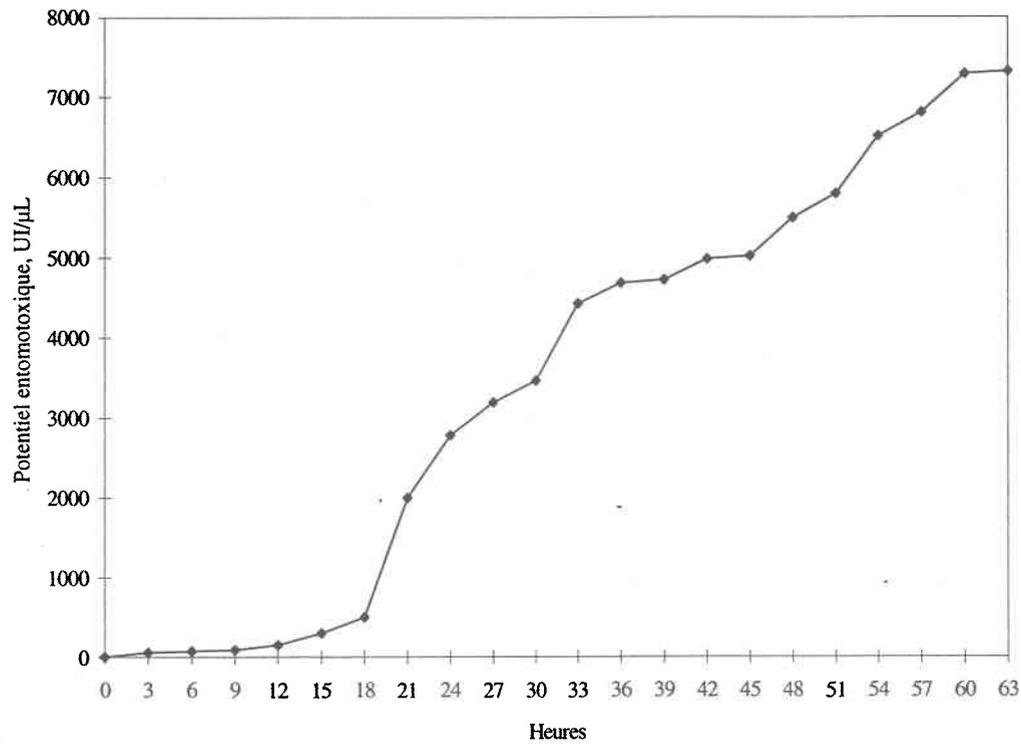


Figure 5.5 Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquièr sans tampon.

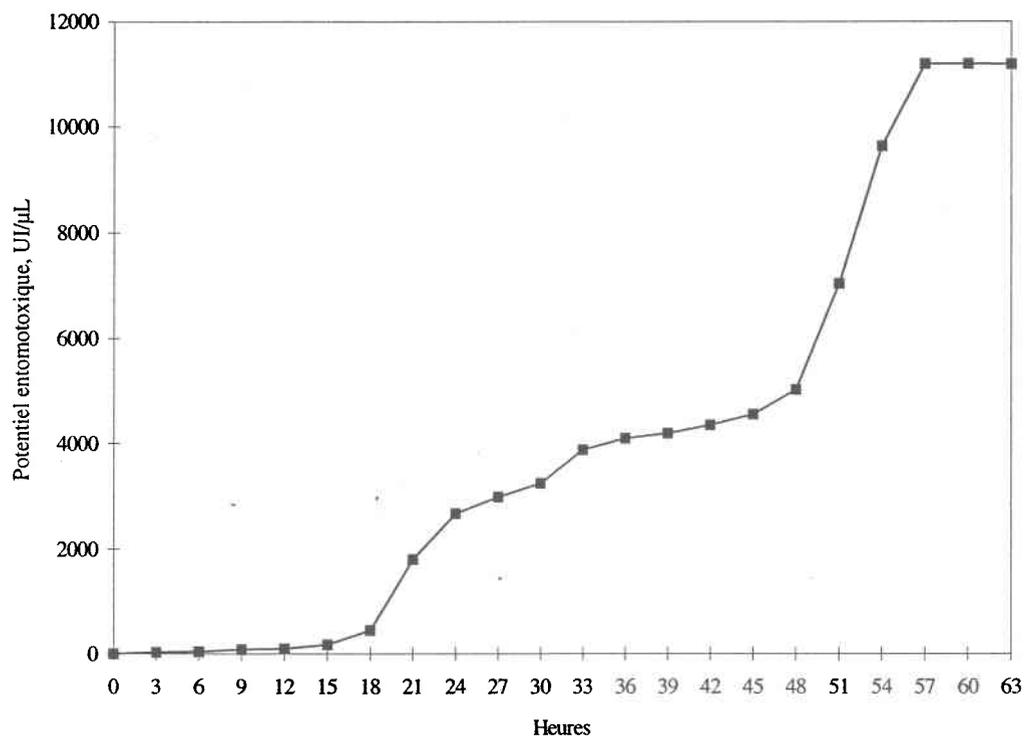


Figure 5.6 Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquière contenant le tampon PBS.

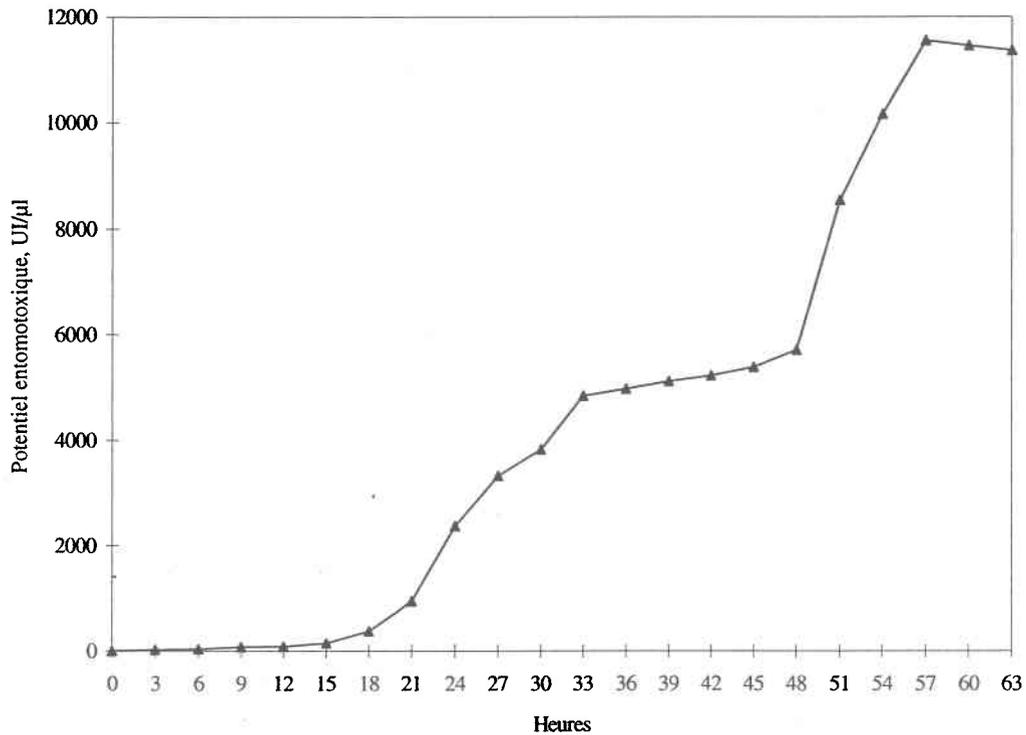


Figure 5.7 Développement de l'entomotoxicité dans la boue de Jonquière contenant le tampon TRIS.

Le Tableau 5.5 montre les valeurs du potentiel entomotoxique pour les trois échantillons employés dans ces expériences et l'indice d'activité relative par rapport au niveau de sporulation.

Tableau 5.5 Influence du contrôle du pH sur le potentiel entomotoxique produit par Bt dans la boue de Jonquière.

Échantillon	Potentiel	Indice d'activité relative
	entomotoxique	(UI/10 ³)
	UI/μL	UI/10 ³ spores
Sans tampon	7500	67
PBS	10100	83
TRIS	10500	78
Farine de soja	3800	12.6

L'échantillon sans solution tampon a le potentiel le plus faible, tandis que dans les échantillons contenant les solutions tampon le potentiel a augmenté, étant un peu plus élevé dans l'échantillon avec la solution tampon TRIS. Ces expériences ont permis d'établir qu'effectivement le contrôle du pH peut influencer positivement le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux, le potentiel a augmenté entre 26% et 28% dans les échantillons avec contrôle du pH par rapport à l'échantillon sans solution tampon.

5.3 Application d'un choc thermique pendant la fermentation de *B. thuringiensis*

Deux échantillons de la boue de Jonquière ont été utilisés dans ces expériences: un avec la boue comme telle et l'autre additionné de la solution tampon TRIS afin de pouvoir déterminer les différences des résultats entre l'échantillon avec contrôle de pH pendant la fermentation et celui sans contrôle.

5.3.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis*

Les échantillons ont été préparés selon ce qui est indiqué dans la section 2.5.3 et le décompte total et celui des spores furent évalués chaque trois heures pendant 72 heures jusqu'à la sporulation maximale selon la technique indiquée dans le point 2.1.2. Les Figures 5.8 et 5.9 montrent les courbes de croissance et de sporulation pour les deux échantillons, la flèche dans la Figure 5.8 indique le moment du changement de la température.

La boue de Jonquière sans contrôle de pH pendant la fermentation présente une phase de latence de six heures, suivie par la phase de croissance exponentielle qui continue jusqu'à 24 heures. Pour la boue additionnée de la solution tampon TRIS, la phase de latence dure neuf heures suivie de la phase de croissance exponentielle jusqu'à 24 heures. Après la phase de croissance exponentielle (24 heures) la température a été abaissée à 25 °C afin de promouvoir la sporulation de la bactérie par le choc thermique. Le compte total final, le compte de spores, le pourcentage de sporulation et le taux spécifique de croissance μ_{\max} (Annexe J) des deux échantillons soumis au choc thermique sont montrés dans le Tableau 5.6.

Dans le cas de la boue sans contrôle de pH, la sporulation de *B. thuringiensis* a commencé après 15 heures et dans la boue avec le tampon TRIS elle a débuté à 18 heures. Le temps pour le début de la sporulation est semblable à ceux rencontrés dans les expériences faites pour évaluer l'influence d'un pH stable en ajoutant une solution tampon.

Le pourcentage de sporulation des échantillons soumis au choc thermique est de 85 % pour la boue sans tampon et de 93% dans l'échantillon avec le tampon TRIS, tandis que le taux maximum spécifique de croissance a la même valeur pour les deux échantillons, soit 0.08 h⁻¹. Ces pourcentages de sporulation et les valeurs du taux de croissance sont très similaires à ceux obtenus pour les mêmes échantillons dans les expériences réalisées avec ou sans contrôle du pH décrites dans le point 5.2 de ce chapitre (Tableau 5.5).

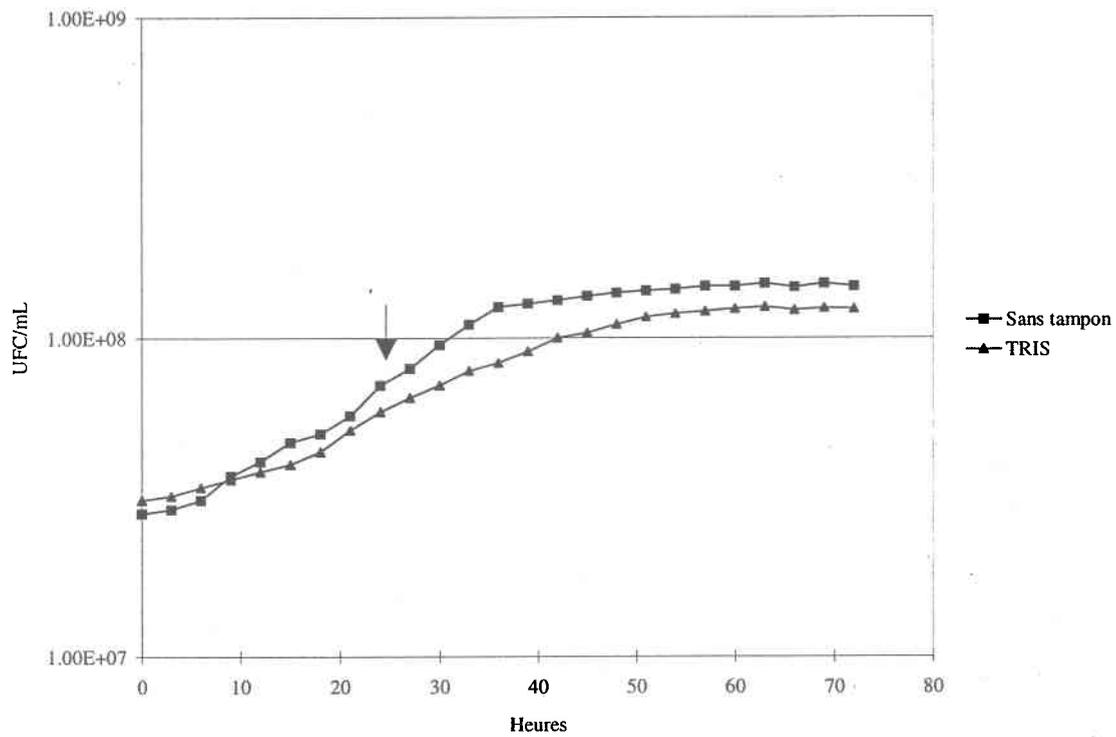


Figure 5.8 Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la croissance de Bt dans la boue de Jonquière.

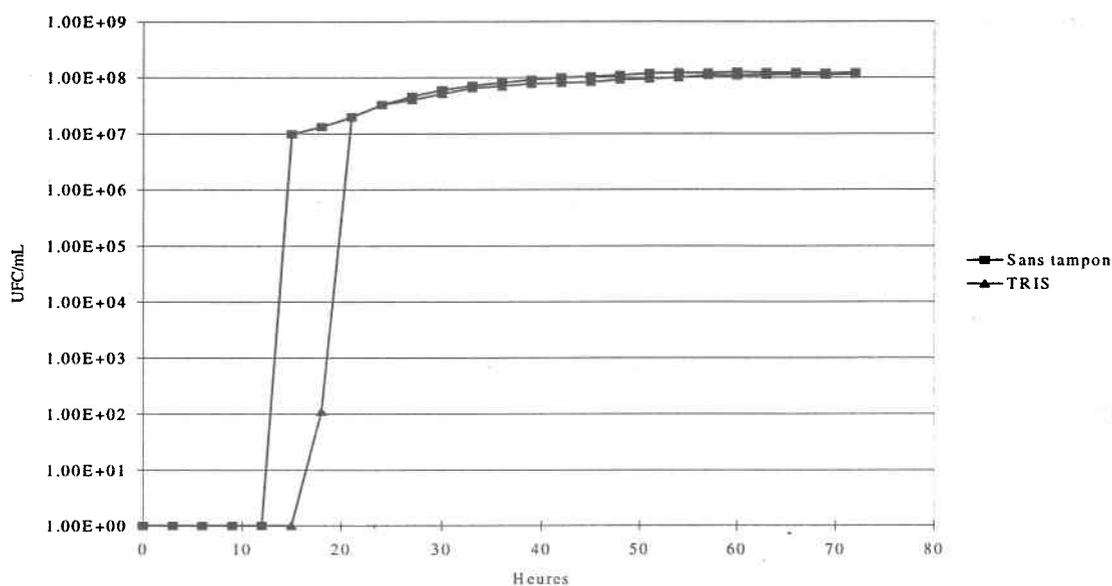


Figure 5.9 Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.

Tableau 5.6 Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.

Échantillon	Compte total final UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Pourcentage de sporulation %	μ_{\max} h^{-1}
Sans tampon	1.45×10^8	1.23×10^8	85	0.08
Avec TRIS	1.23×10^8	1.15×10^8	93	0.08

Selon les résultats trouvés dans les deux échantillons, il ne semble pas y avoir une influence du choc thermique sur le niveau de sporulation puisque les pourcentages de sporulation sont similaires à ceux trouvés dans les expériences précédentes de la section 5.2, mais cette expérience peut confirmer le fait que le contrôle du pH pendant la fermentation est bénéfique pour augmenter le niveau de sporulation de *B. thuringiensis*. Comme le changement de température a été réalisé une fois finie la phase de croissance exponentielle, il n'a pas eu de l'influence sur le taux de croissance qui présente pour les deux échantillons les mêmes valeurs que celles retrouvées dans les expériences décrites dans la section 5.2 en utilisant la boue sans tampon et additionnées du tampon TRIS.

5.3.2 Détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux

Les échantillons employés pour déterminer le potentiel entomotoxique étaient les derniers échantillons obtenus après la sporulation de la bactérie. La technique utilisée pour la préparation de la diète employée dans ces expériences était la technique d'incorporation mentionnée dans la section 2.9.2.2. Les résultats sur la détermination du niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* sous ces conditions de fermentation sont présentés dans le Tableau 5.7 ainsi que leur indice d'activité relative par rapport aux niveaux de spores produites.

Pour la boue sans contrôle de pH, le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux était de 7300 UI/ μ L et pour l'échantillon avec le tampon TRIS, il était de 10200 UI/ μ L. L'indice d'activité relative pour l'échantillon sans tampon est de 59 UI/ 10^3 spores et celui de l'échantillon avec le tampon TRIS est de 83 UI/ 10^3 spores. Le niveau d'entomotoxicité du complexe spores-cristaux obtenu dans ces expériences avec la boue de Jonquière sans tampon et avec le tampon TRIS est très similaire aux valeurs trouvées dans les expériences décrites dans la section 5.2 (contrôle du pH pendant la fermentation) en utilisant ces deux échantillons. C'est encore dans l'échantillon avec contrôle du pH que le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux a été le plus élevé.

Tableau 5.7 Influence du choc thermique et du contrôle de pH sur l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par Bt dans la boue de Jonquière.

Échantillon	Potentiel entomotoxique	Indice d'activité relative
	UI/ μ L	UI/10 ³ spores
Sans tampon	7300	59
Avec TRIS	10200	83

5.4 Discussion

La littérature mentionne que la température optimale pour la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* se trouve aux environs de 28 °C et 32 °C, mais que la croissance est plus lente à 28 °C (Rowe et Margaritis, 1987). Les recherches faites pour étudier l'effet que la température peut avoir sur le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux démontrent qu'il existe une diminution dans la production de la δ -endotoxine quand la température de fermentation se trouve hors de cet intervalle (Abdel-Hameed *et al.*, 1991).

D'après les résultats obtenus lors des expériences réalisées avec la boue de Jonquière à différents pH d'hydrolyse et différentes températures de fermentation, les températures de 34 °C et 36 °C ont affecté la croissance de *B. thuringiensis*. En effet, pour tous les pH essayés, les comptes totaux finaux viables de la bactérie à ces températures sont inférieurs dans un ordre de magnitude aux comptes rencontrés à 30 °C et 32 °C, sauf pour le pH=7 et 30 °C. Les pourcentages de sporulation à ces températures (34 °C et 36 °C) sont aussi faibles en comparant avec les pourcentages de sporulation d'autres températures dans les pH = 4,6 et 7. La Figure 5.2 indique que sous ces deux températures (34 °C et 36 °C) il y a une tendance à obtenir un plus faible compte de spores qu'avec 30 °C et 32 °C.

Par rapport au taux maximum spécifique de croissance, μ_{\max} (h^{-1}), l'effet négatif des températures 34 °C et 36 °C est plus évident, sauf pour les échantillons hydrolysés à pH=2 où les valeurs sont près des valeurs rencontrées dans les autres températures. Pour les pH=4, 6 et 7, à ces températures (34 °C et 36 °C) les taux de croissance de la bactérie sont les plus faibles pour l'ensemble des échantillons (entre 0.02 et 0.05 h^{-1}).

En analysant les résultats du potentiel entomotoxique obtenu à chaque pH et différente température, c'est toujours à 36 °C que le potentiel entomotoxique a été le plus affecté. Dans les quatre pH employés, il varie entre 3500 UI/ μL au pH=6 et 5200 UI/ μL au pH=2, tandis que le potentiel entomotoxique obtenu à 32 °C était de 7300 UI/ μL au pH=7. Ceci confirme qu'une température au-dessus de 32 °C peut affecter le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux comme indiqué par Abdel-Hameed *et al.* (1991).

La composition du milieu de culture est aussi un facteur qui affecte la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis* (Mummigati et Raghunathan, 1990; Obeta et Okafor, 1984). Cette situation pourrait expliquer les différences entre les comptes totaux, les comptes de spores, les pourcentages de sporulation et les niveaux entomotoxiques des complexe spores-cristaux trouvées parmi les seize échantillons utilisés dans les expériences réalisées avec différents pH et températures. L'hydrolyse de la boue réalisée au différents niveaux de pH a affecté la quantité de matière disponible pour *B. thuringiensis*, mais il ne semble pas y avoir un lien directe entre le niveau d'hydrolyse donné aux échantillons et le potentiel entomotoxique déterminé dans les complexes spores-cristaux obtenus. Mais ce qui peut être tiré de ces expériences, c'est que dans le cas de la boue de Jonquière il est possible de l'employer à son pH original (pH=7) ce qui évite le coût de l'ajustement du pH. De plus, la température optimale pour faire la fermentation serait entre 30 °C et 32 °C, ce qui correspond à ce qui est mentionné dans la littérature comme des températures favorisant la production de la δ -endotoxine (Rowe et Margaritis, 1987).

Il est bien connu que les conditions de fermentation peuvent influencer la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis* (Foda et Salama, 1986; Avignone-Rossa et Mignone, 1995). Parmi ces conditions, le pH est un facteur important puisque s'il est contrôlé entre 6.5 et 7.5 pendant la fermentation, la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine sont favorisées (Foda *et al.*, 1985; Abdel-Hameed *et al.*, 1991).

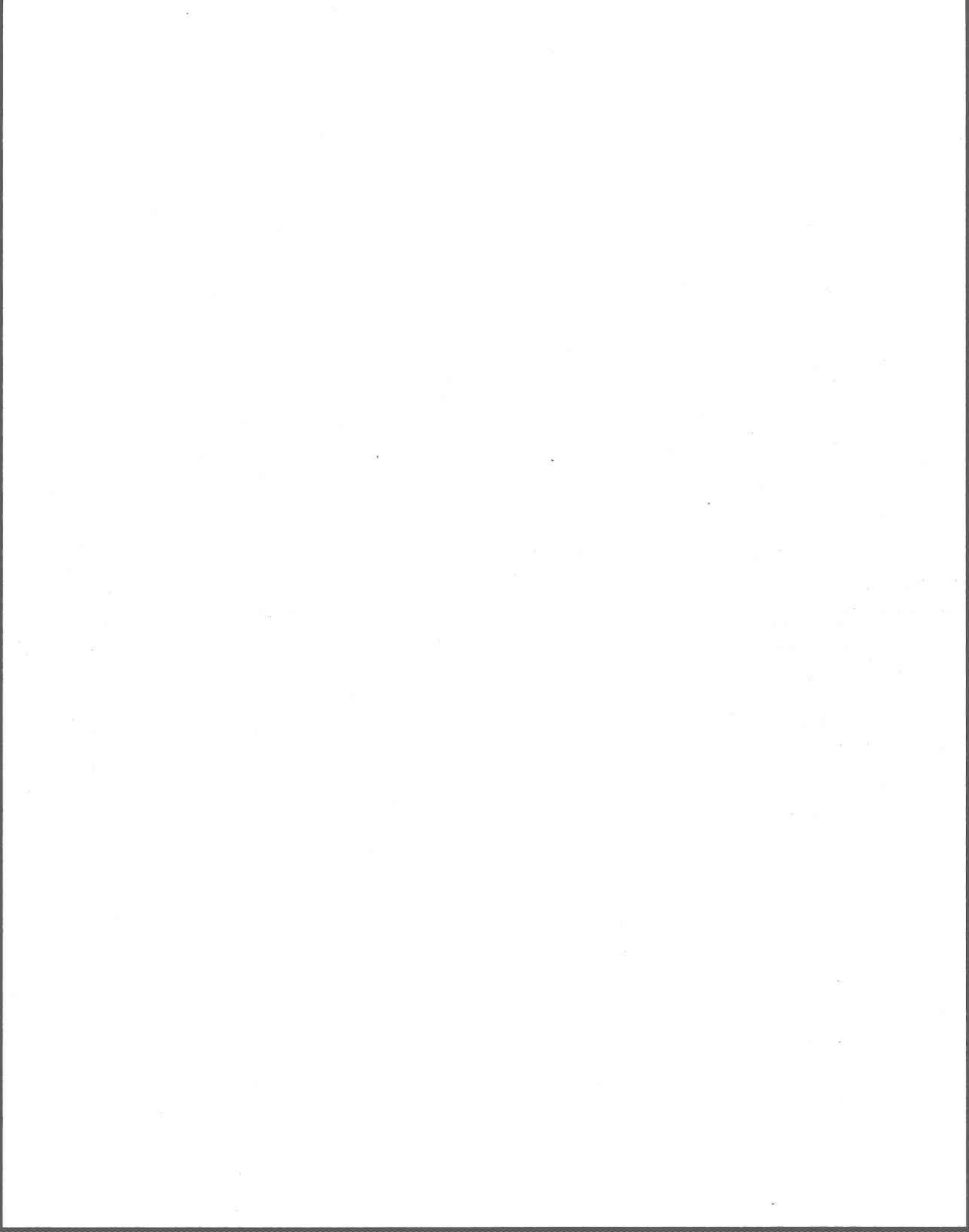
L'ajout des tampons afin de maintenir le pH constant pendant la fermentation a eu un impact bénéfique sur le pourcentage de sporulation et le niveau d'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis*. Le pourcentage de sporulation de la bactérie dans la boue avec contrôle du pH s'est accru par rapport au pourcentage de sporulation de la bactérie dans l'échantillon sans solution tampon. Quand il n'y a pas eu contrôle du pH pendant la fermentation, le pourcentage de sporulation était de 80%, mais en ajoutant les tampons les pourcentages étaient de 90% avec le tampon PBS et de 94% avec le tampon TRIS. L'effet des conditions d'un pH constant pendant la fermentation sur la croissance de *B. thuringiensis* pourrait s'expliquer de la façon suivante: si le pH ne change pas dans le milieu de culture, la phase de sporulation survient plus tard, ce qui favorise le pourcentage de sporulation finale comme ce qui a été constaté dans ces expériences. Comme l'indique la littérature, le contrôle de pH aide à améliorer le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux. En effet, le potentiel entomotoxique était de 7500 UI/ μ l dans l'échantillon sans tampon, tandis que dans les échantillons avec contrôle de pH il a atteint 10100 UI/ μ l pour l'échantillon avec le tampon PBS et 10500 UI/ μ l pour l'échantillon contenant le tampon TRIS. Il a été constaté qu'effectivement, quand le pH est maintenu constant pendant la fermentation la production de la δ -endotoxine est accrue ce qui augmente le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux (Abdel-Hameed *et al.*, 1991). La composition différente des tampons TRIS et PBS a eu un impact sur la croissance et la sporulation de la bactérie, ce qui pourrait expliquer les différences dans les pourcentages de sporulation et les niveaux entomotoxiques.

Les résultats des expériences réalisées par Kanda (1987) avec *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 ont démontré que les gènes qui codent pour l'entomotoxicité chez cette bactérie s'expriment non seulement pendant la phase de sporulation mais ils peuvent aussi s'exprimer pendant la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Ce fait a été mis en évidence comme le montrent les Figures 5.6, 5.7 et 5.8. où l'entomotoxicité a commencé à se manifester à partir du prélèvement réalisé à trois heures dans les trois échantillons.

Le choc thermique donné aux échantillons avec ou sans tampon après la phase de croissance exponentielle de *B. thuringiensis* ne semble pas avoir une influence qui pourrait indiquer qu'il y a une amélioration dans le pourcentage de sporulation ou dans le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu. En effet, les pourcentages de sporulation trouvés dans cette expérience sont très similaires par rapport aux pourcentages des expériences décrites dans la section 5.2 (contrôle du pH pendant la fermentation) (85% pour l'échantillon sans contrôle de pH et 93% pour l'échantillon contenant le tampon TRIS). De même, les taux maximum spécifiques de croissance présentent les mêmes valeurs que dans l'expérience du point 5.2, soit 0.08 h^{-1} et les potentiels entomotoxiques présentent presque les mêmes valeurs que dans l'expérience citée (7300 UI/ μL pour l'échantillon sans contrôle de pH et 10200 UI/ μL pour l'échantillon avec contrôle du pH à l'aide du tampon TRIS). Cette expérience confirme le fait que le contrôle du pH pendant la fermentation de *B. thuringiensis* est bénéfique pour améliorer les niveaux entomotoxiques du complexe spores-cristaux produit par la bactérie.

La littérature mentionne des valeurs du taux de croissance $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$ qui varient entre 1.5 h^{-1} pour la variété *galleriae* (Sakharova *et al.*, 1985) à 0.7 h^{-1} pour les variétés *kurstaki* et *israelensis* (Arcas *et al.*, 1987; Avignone-Rossa *et al.*, 1992). En analysant les taux maximum spécifiques de croissance déterminés dans toutes ces expériences, les valeurs estimées se trouvent au-dessous des valeurs signalées dans la littérature, mais le niveau de toxicité atteint par le complexe spores-cristaux produit dans la boue de Jonquière avec

contrôle du pH est très acceptable par rapport au niveau entomotoxique du Foray 48B. Donc probablement si le taux de croissance peut être accru en modifiant certains de paramètres de la fermentation, cela pourrait se refléter au niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux. Il serait recommandable de réaliser des études plus approfondies pour évaluer l'influence d'un choc thermique plus sévère que celui réalisé dans ces expériences.



6. INFLUENCE DE L'AGITATION SUR LA PRODUCTION DE *B. thuringiensis* DANS LES BOUES D'ÉPURATION

B. thuringiensis est une bactérie aérobie et la disponibilité de l'oxygène est un des facteurs des plus importants qui affectent son métabolisme pendant sa croissance et sa sporulation. Foda *et al.* (1985) ont étudié l'effet que différents niveaux d'aération avaient sur la culture de *B. thuringiensis* variété *entomocidus* en faisant varier la relation air-milieu. Ils ont trouvé que le compte total, le niveau de sporulation et le potentiel entomotoxique avaient augmenté six fois quand la relation air-milieu était 19:1 par rapport aux résultats trouvés en travaillant avec une relation air-milieu 9:1. Dulmage *et al.* (1990) indiquent qu'une toxicité plus élevée du complexe spores-cristaux est atteinte quand les cultures se trouvent sous un bon niveau d'aération. La littérature indique aussi que des niveaux inférieurs d'entomotoxicité ont été observés avec des complexes spores-cristaux obtenus quand les conditions d'aération n'étaient pas optimales (Bernhard et Utz, 1993; Holmberg *et al.*, 1980; Foda *et al.*, 1985; Pearson et Ward, 1988).

Donc, il est évident qu'un bon niveau d'aération pendant la réalisation des cultures de *B. thuringiensis* est une condition qui peut favoriser la sporulation et le niveau entomotoxique des cristaux produits (Scherrer *et al.*, 1991), de telle façon qu'il est important d'éviter les conditions anaérobies.

Ce chapitre présente les résultats des expériences réalisées afin de déterminer l'influence que différents régimes d'agitation peuvent avoir sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spore-cristaux de *B. thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture. Quatre régimes d'agitation ont été utilisés (50 rpm, 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm) et les expériences ont été faites avec la boue de Jonquière. Les expériences décrites dans les chapitres 4 et 5 indiquent que le contrôle du pH à l'aide

du tampon TRIS a eu une influence positive sur le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux d'où le fait d'avoir utilisé encore un groupe d'échantillons contenant cette solution pour pouvoir comparer la performance de la boue sans contrôle de pH avec celle où le contrôle du pH a été fait avec la solution TRIS.

6.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis*

Les échantillons de la boue de Jonquière comme telle et additionnée avec le tampon TRIS ont été préparés selon ce qui est indiqué dans la section 2.2.2.3. Ils ont étéensemencés avec 5% v/v de l'inoculum de *B. thuringiensis* et soumis aux différents régimes d'agitation choisis, soit 50 rpm, 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm. Un échantillonnage a été fait à chaque trois heures afin de faire le décompte total et le décompte de spores et les résultats ont été employés pour obtenir les courbes de croissance et de sporulation de *B. thuringiensis* qui apparaissent dans les Figures 6.1 A, B, C, et D. Chacun des régimes d'agitation employés a eu une influence sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière avec ou sans la solution tampon TRIS. Le Tableau 6.1 présente les valeurs du compte total final viable (compte total viable, UFC/mL), compte de spores (compte de spores, UFC/mL), pourcentage de sporulation (%), la période de fermentation (jours) et le taux maximum spécifique de croissance μ_{\max} de *B. thuringiensis* cultivé dans les différents échantillons. L'Annexe K montre les calculs du μ_{\max} .

La croissance de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière sans la solution tampon TRIS sous l'agitation à 50 rpm était très faible comme le montre la Figure 6.1 A; la bactérie n'a pas été capable de se développer; le taux de croissance a une faible valeur, soit 0.02 h^{-1} . Le compte total final viable était de 1.98×10^7 UFC/mL, ce qui représente une augmentation de seulement 1.5 fois la valeur du compte total initial (1.30×10^7 UFC/mL). À 150 rpm la phase de latence a duré quinze heures (Figure 6.1 A) et puis la bactérie a commencé à se développer; le taux maximum spécifique de croissance a augmenté pour atteindre une valeur de 0.05 h^{-1} et le compte final était de 1.09×10^8 UFC/mL, soit 2.8 fois le compte initial. Sous l'agitation à 250 rpm la phase de latence a duré jusqu'à la sixième

heure (Figure 6.1 A) après laquelle la croissance exponentielle de *B. thuringiensis* a commencé; le taux maximum spécifique de croissance sous ce régime d'agitation était de 0.08 h^{-1} et le compte total final viable a atteint 1.4×10^8 UFC/mL, soit 5.1 fois le compte initial (2.7×10^7 UFC/mL). Finalement, à 350 rpm la phase de latence a duré les trois premières heures (Figure 6.1 A), suivie par la phase de croissance exponentielle qui a duré jusqu'à la neuvième heure. Le taux maximum spécifique de croissance était de 0.07 h^{-1} et la croissance de la bactérie a atteint un compte total final viable de 1.12×10^8 UFC/mL, soit 3.6 fois le compte initial (3.05×10^7 UFC/mL).

La croissance de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière additionnée du tampon TRIS sous l'agitation à 50 rpm était aussi très faible comme le montre la Figure 6.1 C; La bactérie n'a pas été capable de se développer, le taux maximum spécifique de croissance présente une faible valeur, soit 0.02 h^{-1} . Le compte total final viable était dans ce cas de 2.45×10^7 UFC/mL un peu plus élevé que celui de la boue sans solution tampon. À 150 rpm la phase de latence a duré trois heures (Figure 6.1 C) et après la bactérie a commencé à se développer; le taux maximum spécifique de croissance a augmenté pour atteindre la valeur de 0.05 h^{-1} entre 18 et 21 heures et le compte final était de 1.0×10^8 UFC/mL. Sous l'agitation à 250 rpm la phase de latence a duré jusqu'à la troisième heure (Figure 6.1 C) après laquelle la croissance exponentielle de *B. thuringiensis* a commencé; le taux maximum spécifique de croissance sous ce régime d'agitation était de 0.08 h^{-1} et le compte total final viable a atteint 1.42×10^8 UFC/mL. Finalement, à 350 rpm la phase de latence a duré les trois premières heures (Figure 6.1 C), suivie par la phase de croissance exponentielle qui a duré jusqu'à la neuvième heure. Le taux maximum spécifique de croissance était de 0.07 h^{-1} et la croissance de la bactérie a atteint un compte total final viable de 1.4×10^8 UFC/mL.

Avec une agitation de 50 rpm la sporulation de *B. thuringiensis* dans les deux échantillons (avec ou sans tampon TRIS) a été très faible. La bactérie a commencé à sporuler dans la boue sans solution tampon à 24 heures (Figure 6.1B) et à 27 heures dans la boue additionnée du tampon TRIS (Figure 6.1 D). Le compte final de spores dans la boue sans solution tampon a été de 3.2×10^6 UFC/mL et le pourcentage de sporulation a

atteint seulement 16 %. Pour l'échantillon additionné du tampon TRIS le compte final de spores a été de 3.7×10^6 UFC/mL avec aussi un faible pourcentage de sporulation, seulement de 15 %. Ces sont les pourcentages de sporulation les plus faibles de l'ensemble des échantillons.

Pour le régime d'agitation de 150 rpm, le compte final de spores dans la boue sans solution tampon est de 7.8×10^7 UFC/mL. *B. thuringiensis* a commencé à sporuler à 21 heures (Figure 6.1 B) et le pourcentage de sporulation a atteint 71%. Pour l'échantillon qui contient le tampon TRIS, la sporulation a commencé à 24 heures (Figure 6.1 D), le compte final de spores a été de 7.6×10^7 UFC/mL et le pourcentage de sporulation de 75%.

L'agitation à 250 rpm a permis d'améliorer les pourcentages de sporulation dans les deux échantillons. Ainsi, pour l'échantillon sans contrôle de pH, la sporulation de *B. thuringiensis* a commencé à 18 heures (Figure 6.1 B), le compte final de spores était de 1.12×10^8 UFC/mL et le pourcentage de sporulation a été de 80%. Pour l'échantillon additionné du tampon TRIS la sporulation de *B. thuringiensis* a commencé aussi à 18 heures (Figure 6.1 D), le compte final de spores a été de 1.34×10^8 UFC/mL et le pourcentage de sporulation a atteint 94%, ce qui correspond aux valeurs obtenues dans les expériences précédentes réalisées avec la même boue sous des conditions semblables (chapitre 5, expériences réalisées avec et sans contrôle du pH).

Sous une agitation de 350 rpm dans l'échantillon de boue sans contrôle de pH la sporulation a commencé à 12 heures (Figure 6.1 B), le compte final de spores était de 1.02×10^8 UFC/mL et le pourcentage de sporulation de 91%. Pour l'échantillon de la boue de Jonquière avec du tampon TRIS, la sporulation a commencé à 15 heures (Figure 6.1 D), le compte final de spores a atteint la valeur de 1.38×10^8 UFC/mL et le pourcentage de sporulation était dans ce cas de 98%, le plus élevé parmi tous les échantillons.

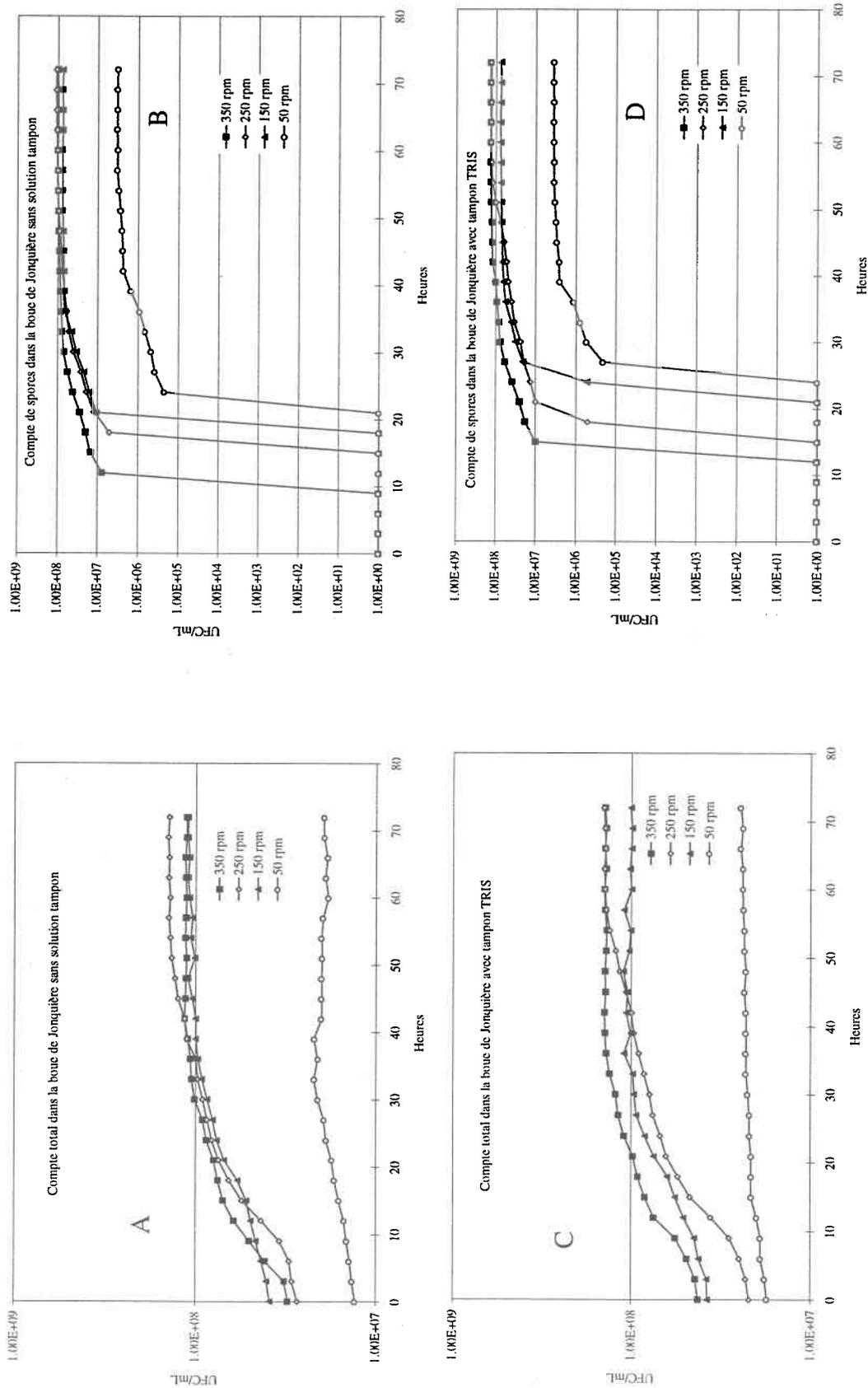


Figure 6.1 Influence de l'agitation sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière.

Tableau 6.1 Influence de l'agitation sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Jonquière.

Régime d'agitation	Échantillon	Compte total final viable (UFC/mL)	Compte de spores (UFC/mL)	Pourcentage de sporulation	Temps (jours)	μ_{\max} (h^{-1})
50 rpm	Jonquière	1.98×10^7	3.2×10^6	16	3	0.02
	Jonquière + TRIS	2.45×10^7	3.7×10^6	15	3	0.02
150 rpm	Jonquière	1.09×10^8	7.8×10^7	71	3	0.05
	Jonquière + TRIS	1×10^8	7.6×10^7	75	3	0.05
250 rpm	Jonquière	1.4×10^8	1.12×10^8	80	3	0.08
	Jonquière + TRIS	1.42×10^8	1.34×10^8	94	3	0.08
350 rpm	Jonquière	1.12×10^8	1.02×10^8	91	3	0.07
	Jonquière + TRIS	1.4×10^8	1.38×10^8	98	3	0.07

6.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux

Comme il a déjà été établi dans la littérature, l'utilisation des différents niveaux d'agitation donnée aux échantillons pendant la culture de *B. thuringiensis* peut avoir une influence sur la croissance et la sporulation de cette bactérie. Dans les expériences décrites dans ce chapitre, différents niveaux de sporulation ont été trouvés parmi les échantillons, donc il est possible d'espérer trouver des variations dans les niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux. La détermination du potentiel

entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenus a été réalisée par des bioessais en utilisant la technique de l'incorporation dans la diète décrite dans la section 2.9.2.2. Les valeurs du potentiel entomotoxique de chacun des complexes spores-cristaux obtenus avec la boue de Jonquière sans ou avec contrôle de pH sont présentées dans le Tableau 6.2, ainsi que leur indice d'activité relative par rapport aux niveaux de sporulation des échantillons.

Pour un régime d'agitation de 50 rpm, la boue de Jonquière sans tampon a une toxicité de 3400 UI/ μ L et une activité relative de 1060 UI/ 10^3 spores, tandis que pour la boue avec le tampon TRIS le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux était de 5300 UI/ μ L et l'activité relative de 1400 UI/ 10^3 spores.

Quand le régime d'agitation a été augmenté à 150 rpm, le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux s'est accru dans les deux échantillons. Dans la boue sans contrôle de pH, il est de 6000 UI/ μ L et son activité relative de 77 UI/ 10^3 spores. Pour l'échantillon avec le tampon TRIS le niveau entomotoxique était de 9300 UI/ μ L avec un indice d'activité relative de 122 UI/ 10^3 spores.

Pour une agitation de 250 rpm, le complexe spores-cristaux présente un niveau entomotoxique de 7600 UI/ μ L dans l'échantillon qui ne contient pas le tampon TRIS et son activité relative était de 68 UI/ 10^3 spores. Pour l'échantillon de boue contenant le tampon TRIS le complexe spores-cristaux présente une entomotoxicité de 10000 UI/ μ L et une activité relative de 75 UI/ 10^3 spores.

Finalement, quand les échantillons ont été soumis à une agitation de 350 rpm, dans celui qui ne contient pas le tampon TRIS, le niveau entomotoxique était de 7100 UI/ μ L et son activité relative de 70 UI/ 10^3 spores. Dans l'échantillon de la boue de Jonquière qui contient le tampon TRIS l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux obtenu était de 9100 UI/ μ L et son activité relative de 66 UI/ 10^3 spores.

Tableau 6.2 Influence de l'agitation sur le potentiel entomotoxique de Bt.

Régime d'agitation	Échantillon	Entomotoxité (UI/ μ l)	Indice d'activité relative (UI/10 ³ spores)
50 rpm	Jonquière	3400	1060
	Jonquière + TRIS	5300	1400
150 rpm	Jonquière	6000	77
	Jonquière + TRIS	9300	122
250 rpm	Jonquière	7600	68
	Jonquière + TRIS	10000	75
350 rpm	Jonquière	7100	70
	Jonquière + TRIS	9100	66

La Figure 6.2 montre la relation existant entre les différents niveaux d'agitation, les comptes de spores et l'indice d'activité relative des complexes spores-cristaux. La courbe dans cette figure indique que des régimes d'agitation faible ne favorisent pas la sporulation de *B. thuringiensis*. Ainsi, avec le régime d'agitation de 50 rpm la sporulation de cette bactérie dans la boue sans le contrôle du pH effectué avec le tampon TRIS, a été très faible. Cette situation a eu un impact négatif sur le niveau entomotoxique des complexe spores-cristaux, puisque leur potentiel sous cette basse agitation présente les valeurs plus faibles pour l'ensemble des échantillons. L'agitation à 150 rpm a amélioré les comptes de spores des échantillons avec et sans contrôle du pH et en conséquence leur

niveau entomotoxique s'est aussi amélioré. Mais l'agitation ne peut pas être augmentée indéfiniment car l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux peut être affectée comme le montrent les résultats obtenus à 350 rpm (avec ou sans contrôle du pH) où les niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux sont descendus par rapport aux valeurs trouvées à 250 rpm.

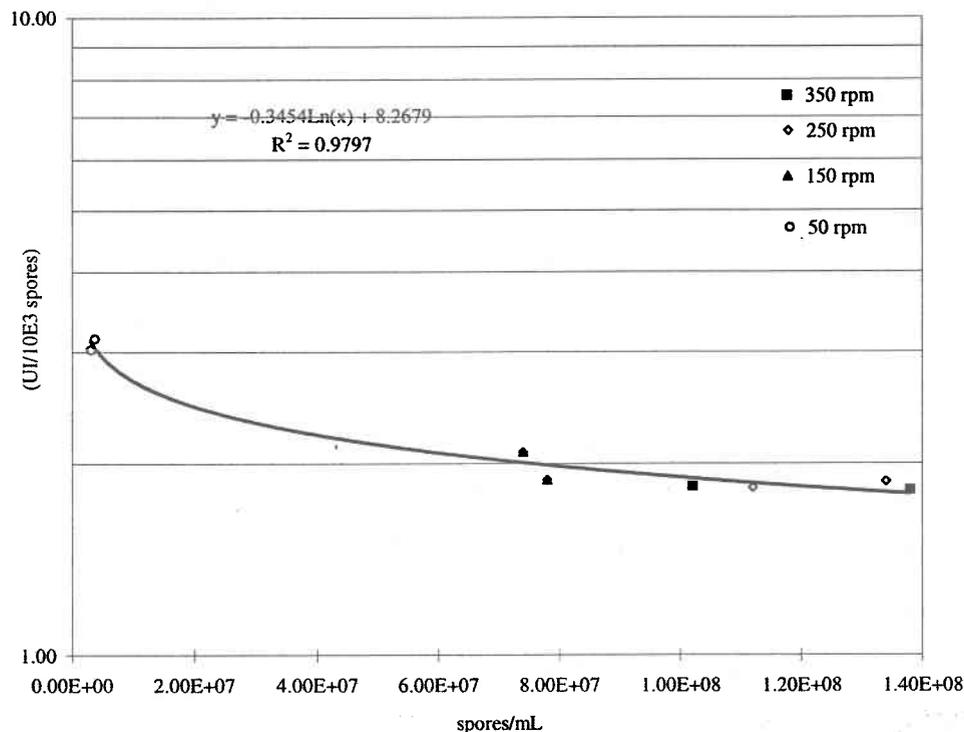


Figure 6.2 Influence de l'agitation sur l'indice d'activité relative.

6.3 Discussion

La production de la δ -endotoxine, qui constitue l'élément fondamental des cristaux produits par *B. thuringiensis*, a lieu pendant la phase de sporulation de cette bactérie. Donc il est très important d'avoir une bonne croissance de la bactérie et un bon niveau de sporulation dans le milieu de culture employé pour l'obtention du complexe spores-cristaux. Si les conditions d'aération ne sont pas adéquates, la croissance de *B. thuringiensis* peut devenir lente et la sporulation inhibée, d'où la nécessité de compter toujours sur un bon niveau d'aération pendant la réalisation des fermentations avec cette bactérie (Bernhard et Utz, 1993; Foda *et al.*, 1985).

Les résultats de ces expériences montrent l'importance qu'un bon niveau d'aération a sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis*, quand cette bactérie a été cultivée dans une boue d'épuration. Ces expériences ont été réalisées dans des flacons agités à différentes vitesses où l'aération est fournie par la diffusion naturelle de l'air à travers le bouchon en coton vers le milieu de culture; l'agitation renouvelle la surface du milieu en contact avec l'air en facilitant la dissolution de l'oxygène à un niveau plus élevé à mesure que le régime d'agitation augmente (Sikdar *et al.*, 1993).

Les résultats montrent que lorsque les échantillons ont été soumis au niveau d'agitation de 50 rpm, la croissance de la bactérie a été très faible, même dans l'échantillon contenant la solution tampon TRIS, qui dans ce cas n'a pas eu d'influence sur le développement de la bactérie. Le pourcentage de sporulation atteint dans ces échantillons a présenté les valeurs les plus basses (15%-16%) et leurs niveaux d'entomotoxicité sont aussi les plus bas pour l'ensemble des résultats, 3400 UI/ μ L pour celui sans solution tampon et 5300 UI/ μ L pour celui contenant la solution TRIS. Les valeurs d'activité relative de ces deux échantillons sont les plus hautes pour l'ensemble des échantillons aux différents régimes d'agitation, mais il faut tenir compte que les comptes finaux de spores dans les deux échantillons étaient très faibles. Ceci a fait augmenter le rapport entomotoxicité/quantité de spores, donc les niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux étaient le plus faibles.

En augmentant le niveau d'agitation à 150 rpm, la croissance de *B. thuringiensis* s'est améliorée dans les deux échantillons (avec ou sans contrôle du pH) comme l'indiquent les taux de croissance qui ont augmenté pour atteindre la valeur de 0.05 h^{-1} pour les deux échantillons. Les pourcentages de sporulation ont augmenté entre 4 et 5 fois par rapport à ceux des échantillons sous une agitation à 50 rpm, ils ont atteint plus de 70% et c'était l'échantillon additionné de la solution tampon TRIS qui présente le pourcentage le plus élevé (75%). L'activité entomotoxique s'est accrue notablement, surtout dans l'échantillon contenant la solution tampon (9300 UI/ μ l).

C'est à 250 rpm que les niveaux entomotoxiques atteints sont les plus élevés pour tous les régimes d'agitation dans les deux échantillons. L'entomotoxicité dans l'échantillon sans solution tampon TRIS était de 7600 UI/ μ l et dans l'échantillon avec contrôle du pH la valeur est de 10000 UI/ μ l. Les valeurs des niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux estimées dans ces expériences sont tout à fait en accord avec les valeurs trouvées dans les expériences réalisées pour évaluer l'influence du contrôle du pH (chapitre 5). Les pourcentages de sporulation ont augmenté par rapport à ceux rencontrés à 150 rpm, mais c'est l'échantillon additionné du tampon TRIS qui présente l'augmentation du pourcentage de sporulation la plus importante (94%) pour les deux échantillons. L'activité relative des échantillons sous ce régime d'agitation présente des valeurs inférieures (68 UI/ 10^3 pour l'échantillon sans contrôle du pH et 75 UI/ 10^3 pour celui avec le tampon) par rapport à celles des échantillons à 150 rpm en raison de l'augmentation dans les comptes de spores à 250 rpm.

Même si à 350 rpm les pourcentages de sporulation atteints sont les plus hauts parmi tous les échantillons, le niveau entomotoxique a baissé dans les deux échantillons. L'échantillon qui ne contient pas la solution tampon présente un niveau entomotoxique de 7100 UI/ μ L et celui additionné du tampon 9100 UI/ μ L, ce qui représente une diminution de 6.5% pour le premier échantillon et 9% pour le second.

L'ajout de la solution tampon TRIS pour contrôler le pH pendant la fermentation de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière a donné des bons résultats vis-à-vis les résultats de sporulation et du niveau entomotoxique. En effet, dans les régimes d'agitation de 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm, ce sont les échantillons additionnés du tampon qui présentent les plus hauts pourcentages de sporulation. Cette même situation se répète en analysant les résultats du niveau entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus dans les échantillons avec ou sans contrôle du pH. Ce sont toujours les échantillons additionnés du tampon TRIS qui présentent les valeurs d'entomotoxicité les plus élevées. La même conclusion avait été obtenue dans le chapitre 5. Donc effectivement, le contrôle du pH peut avoir une influence positive sur la croissance, la sporulation et la production du

complexe spore-cristaux produit par *B. thuringiensis* comme déjà indiqué (Avignone-Rossa et Mignone, 1995; Ejiofor, 1991; Gonzalez et Carlton, 1984).

Les résultats des expériences réalisées ont montré aussi que le niveau d'agitation a eu une influence sur le développement de *B. thuringiensis* selon le régime employé. L'utilisation de niveaux d'agitation très faibles ne permet pas une bonne diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture ce qui en diminue la quantité disponible pour *B. thuringiensis*. Ceci affecte ainsi sa croissance, sa sporulation et le mécanisme de synthèse de la δ -endotoxine (Avignone-Rossa *et al.*, 1992). Des cellules qui se développent rapidement semblent avoir l'énergie et d'autres facteurs nécessaires pour la sporulation tandis que les cellules qui se développent lentement n'ont pas ces caractéristiques (Chul *et al.*, 1992). En utilisant les régimes d'agitation de 150 rpm, 250 rpm et 350 rpm, *B. thuringiensis* s'est développé beaucoup plus vite qu'à 50 rpm, les taux de croissance le démontrent. Ceci pourrait expliquer le fait que les niveaux de sporulation ont aussi augmenté. Mais dans ces expériences il a été montré que le niveau d'agitation ne peut être augmenté indéfiniment, car cette augmentation ne sert plus à améliorer le niveau entomotoxique des cristaux produits par *B. thuringiensis*. Une situation similaire a déjà été citée dans la littérature par Abdel-Hameed *et al.* (1991), qui en réalisant la fermentation de *B. thuringiensis* H-14 dans un réacteur, signale une diminution du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux en utilisant des régimes d'agitation inférieurs à 100 rpm, mais en même temps il indique qu'une agitation supérieure à 200 rpm occasionne une diminution graduelle du potentiel entomotoxique.

La diminution du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux sous le niveau d'agitation plus élevé (350 rpm) pourrait s'expliquer par une inhibition par excès du substrat, dans ce cas de l'oxygène. Moraes *et al.*, (1980) mentionnent un effet inhibiteur de la concentration de l'oxygène sur le taux de respiration qui dans leurs expériences a diminué après une concentration optimale de ce substrat dans le milieu de culture. Ces chercheurs présentent aussi les valeurs du taux spécifique de croissance μ (h^{-1}) qui a un comportement similaire à celui du taux de respiration, c'est-à-dire qu'il augmente, mais

pas indéfiniment. À mesure qu'augmente la concentration d'oxygène dans le milieu, il commence aussi à diminuer après avoir atteint une valeur optimale à mesure que la concentration d'oxygène continue d'augmenter. Malheureusement ces chercheurs ne présentent pas de résultats sur les niveaux entomotoxiques des complexe spores-cristaux obtenus par rapport aux niveaux d'aération employés dans leurs expériences. Dans nos expériences, le taux maximum spécifique de croissance pour les deux échantillons (avec ou sans solution tampon) à 350 rpm a une valeur inférieure (0.07 h^{-1}) à celle obtenue à 250 rpm (0.08 h^{-1}) et leur niveaux entomotoxiques sont aussi plus bas qu'à 250 rpm. Donc il pourrait s'agir ici d'une situation similaire à celle indiquée par Moraes *et al.* (1980), un effet inhibiteur de la concentration d'oxygène au-dessus d'un niveau optimal pour la croissance et la synthèse de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* dans la boue employée. La culture dans les boues d'épuration de *B. thuringiensis* dans un fermenteur, où les conditions d'aération peuvent être contrôlées, pourrait clarifier ce point. L'influence des effets de la concentration d'oxygène sur le mécanisme de la sporulation et la production de la δ -endotoxine est loin d'être complètement comprise. Il est donc nécessaire de continuer la recherche dans ce domaine.

7. INFLUENCE DES SOURCES ADDITIONNELLES DE NUTRIMENTS DANS LA PRODUCTION DE *B. thuringiensis*

Comme l'activité entomotoxique de *B. thuringiensis* dépend de la production du complexe spores-cristaux, il est désirable d'obtenir des hauts niveaux de sporulation dans les cultures. L'obtention de certains métabolites microbiens peut être encouragée par la variation des conditions de culture (Scherrer *et al.*, 1973); la production du complexe spores-cristaux pourrait donc être améliorée en faisant varier les concentrations des sources de carbone et d'azote dans le milieu de culture.

Les expériences réalisées avec les différents types de boues (Chapitre 4) ont démontré qu'elles étaient capables de soutenir la croissance, la sporulation et la production de δ -endotoxine par *B. thuringiensis* sans être additionnées d'aucune autre source de nutriment, mais le niveau entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus étaient encore faibles en les comparant avec le milieu farine de soja. Parmi les boues employées dans les expériences décrites dans le Chapitre 4, c'était la boue secondaire de Black Lake qui avait donné les meilleurs résultats par rapport au niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux et pour cette raison elle a été choisie dans ces expériences comme milieu de culture pour *B. thuringiensis* afin d'évaluer l'influence que l'addition des nutriments pouvait avoir sur la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux. Dans ces expériences le glucose a été choisi comme source de carbone additionnelle et l'extrait de levure a été employé comme source d'azote et de vitamines.

7.1 Croissance et sporulation de *B. thuringiensis*

La première expérience consistait à additionner différentes concentrations de glucose dans la boue secondaire de Black Lake (BLS). Cinq concentrations de glucose ont été employées et les échantillons ont été préparés selon ce qui est décrit dans la section 2.7.

Le Tableau 7.1 montre les valeurs finales du compte total, comptes de spores, pourcentages de sporulation, les périodes de fermentation et les taux maximum spécifiques de croissance de *B. thuringiensis* dans la boue et les Figures 7.1 A, B, C, et D. L'Annexe L contient les calculs du taux maximum spécifique de croissance.

Un des effets de l'addition du glucose dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) a lieu vis-à-vis du temps de fermentation qui a été moins long dans les échantillons additionnés du glucose (5 jours) que dans l'échantillon sans glucose (10 jours). Dans tous les cas (échantillons avec ou sans glucose), la phase de latence n'a pas été détectée après le premier échantillonnage probablement parce qu'elle a dû avoir lieu avant les premières douze heures de fermentation (Figure 7.1 A). Ensuite dans tous les échantillons additionnés de glucose, la phase de croissance exponentielle a duré jusqu'au premier jour et le profil de croissance a été presque pareil pour tous. Le compte total final viable a augmenté d'un ordre de magnitude ($\times 10^7$) dans tous les échantillons additionnés de glucose par rapport à l'échantillon sans glucose ($\times 10^6$). La numération finale totale viable des échantillons additionnés de glucose montre une augmentation qui varie selon la concentration de glucose, de telle façon que l'échantillon qui contient la plus faible concentration de glucose (40 mg/L) présente le compte total final viable le plus bas de tous (2.3×10^7 UFC/mL) tandis que celui qui contient la concentration la plus haute, soit 200 mg/L de glucose, présente le compte total final viable le plus élevé (3.4×10^7 UFC/mL). L'addition de glucose, même dans la concentration la plus faible employée dans ces expériences (40 mg/L), a stimulé 17 fois la croissance de *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) par rapport à l'échantillon sans glucose et la plus haute concentration de glucose (200 mg/L) a stimulé la croissance 26 fois, ce qui se reflète dans le compte final viable à cette concentration qui a présenté une valeur de 3.4×10^7 UFC/mL. L'addition de glucose a eu aussi un effet positif sur le taux maximum spécifique de croissance de *B. thuringiensis* qui s'est développé plus rapidement dans les échantillons additionnés de cette source de carbone, la valeur a doublé dans tous par rapport à la valeur obtenue avec la boue sans glucose. Le taux maximum spécifique de croissance le plus haut (0.27 h^{-1}) est obtenu à une concentration de glucose de 160 mg/L,

pour les autres concentrations les valeurs du taux maximum spécifique de croissance se trouvent entre 0.24 h^{-1} et 0.25 h^{-1} .

La sporulation de *B. thuringiensis* a commencé dans les échantillons additionnés de glucose le deuxième jour et la sporulation totale a été complétée en 5 jours, tandis que dans la boue non additionnée de glucose, la sporulation a commencé le sixième jour pour se terminer le dixième jour comme le montre la Figure 7.1 B.

Les pourcentages de sporulation dans les échantillons contenant le glucose se sont améliorés par rapport à celui de la boue qui n'en contient pas. En effet, pour l'échantillon qui contient une concentration de 40 mg/L du glucose le pourcentage de sporulation a été de 87% tandis que pour l'échantillon qui contient la concentration la plus élevée de glucose (200 mg/L) le pourcentage de sporulation a été de 88%. Les pourcentages de sporulation pour les échantillons qui contiennent 80 mg/L et 120 mg/L de glucose étaient de 93%, tandis que pour l'échantillon contenant 160 mg/L de glucose le pourcentage était de 90%; le pourcentage de sporulation pour l'échantillon qui ne contient pas de glucose était de 77%.

Le deuxième groupe d'expériences consistait à faire varier la concentration de la source additionnelle de carbone (du glucose) tout en maintenant constante la concentration d'une source additionnelle d'azote, dans ces expériences c'est l'extrait de levure qui a été employée comme source d'azote. Les échantillons ont été préparés selon ce qui est décrit dans la section 2.2.2.4. Les Figures 7.1 C et D montrent la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Black Lake (BL) sous ces conditions.

La phase de latence de la croissance de *B. thuringiensis* a eu lieu probablement aussi avant les premières douze heures dans tous les échantillons et n'a pas été détectée dans le premier échantillonnage. La croissance exponentielle de la bactérie a continué jusqu'au premier jour pour tous les échantillons comme le montre la Figure 7.1 C et la sporulation a commencé le deuxième jour dans tous les échantillons (Figure 7.1 D). Les résultats de

la numération totale finale viable (compte total viable, UFC/mL), compte de spores (UFC/mL), pourcentage de sporulation (%), temps pour la fermentation (jours) et les taux maximum spécifique de croissance (h^{-1}) des produits obtenus sont montrés dans le Tableau 7.2.

L'addition du glucose et de l'extrait de levure dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) n'a pas réduit le temps nécessaire pour l'obtention du complexe spores-cristaux par rapport à la boue additionnée seulement de glucose. Il a été de cinq jours dans les deux cas. Le compte total final viable a augmenté d'un ordre de magnitude ($\times 10^8$) dans les échantillons contenant 40 mg/L d'extrait de levure et 120, 160 et 200 mg/L du glucose par rapport aux comptes totaux finaux viables quand la boue contenait seulement ces mêmes concentrations de glucose et dans les échantillons qui contiennent l'extrait de levure et 40 mg/L et 80 mg/L de glucose, les comptes totaux finaux viables ont augmenté entre 2.5 et 2.7 fois par rapport aux valeurs obtenues seulement avec l'addition du glucose. La numération finale totale viable des échantillons additionnés du glucose et d'extrait de levure croît selon l'augmentation du glucose, de telle façon que l'échantillon qui contient l'extrait de levure et la concentration la plus faible du glucose (40mg/L) présente le compte total final viable le plus bas de tous (6.3×10^7 UFC/mL) tandis que celui qui contient la concentration la plus haute, soit 200 mg/L de glucose, présente le compte total final viable le plus élevé (1.44×10^8 UFC/mL).

Même si la concentration d'extrait de levure employée dans ces expériences était faible, soit 40 mg/L, son incorporation à la boue secondaire de Black Lake (BLS) contenant du glucose a stimulé la croissance de *B. thuringiensis* dans cette boue. La présence d'extrait de levure en plus du glucose dans la boue a eu un effet sur le taux maximum spécifique de croissance de *B. thuringiensis* qui s'est développé plus rapidement dans ces échantillons que dans les échantillons contenant seulement le glucose; la valeur a triplé dans tous les échantillons par rapport à la valeur que présente la boue sans glucose et sans extrait de levure et par rapport aux échantillons additionnées seulement du glucose, les valeurs des taux de croissance ont augmenté entre 33% et 45%, de façon qu'elles varient

entre 0.35 et 0.36 h⁻¹. Ces valeurs se trouvent plus proches de la valeur obtenue avec le milieu farine de soja, soit 0.41 h⁻¹.

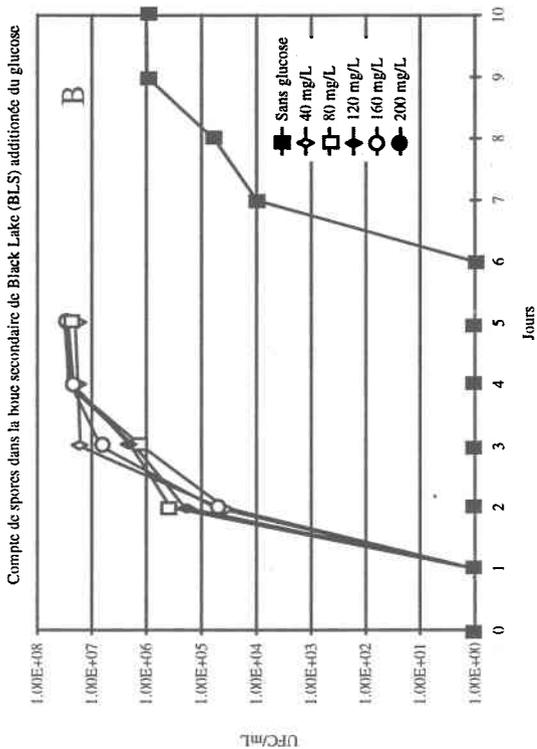
La sporulation de *B. thuringiensis* a commencé le deuxième jour dans les échantillons additionnés de glucose et d'extrait de levure comme le montre la Figure 7.1 D et la sporulation totale a été complétée en 5 jours comme dans le cas des échantillons additionnés seulement du glucose. L'addition d'extrait de levure aux échantillons contenant 40 mg/L et 80 mg/L du glucose a fait augmenter les pourcentages de sporulation par rapport aux valeurs trouvées dans les échantillons contenant seulement ces concentrations de glucose. Ils sont passés de 87% et 93% à 93% et 95%, respectivement. Pour les trois autres échantillons contenant de la levure et 120 mg/L, 160 mg/L et 200 mg/L du glucose, les pourcentages de sporulation ont diminué et se situent entre 71% et 76%.

Tableau 7.1 Influence de l'addition de glucose sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Black Lake (BLS).

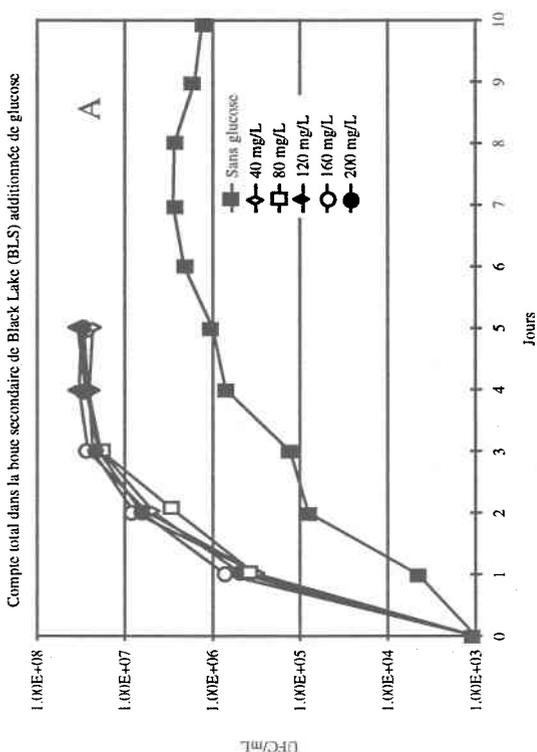
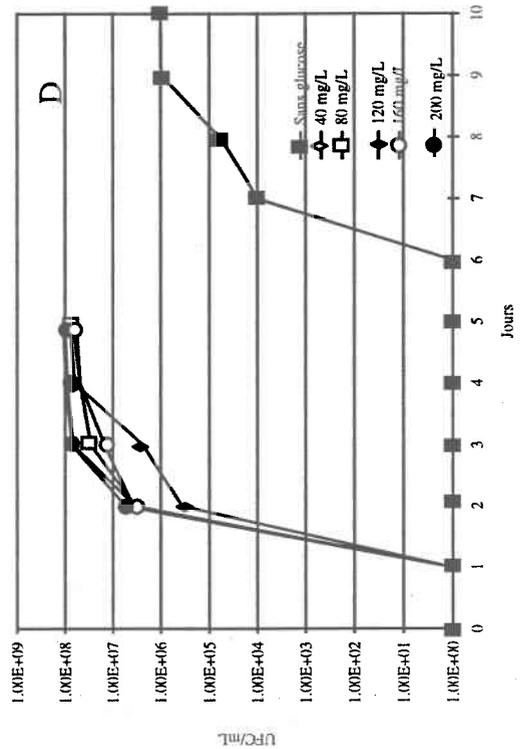
Concentration de glucose (mg/L)	Compte total viable (UFC/mL)	Compte de spores (UFC/mL)	Pourcentage de sporulation (%)	Temps (jours)	μ_{\max} (h^{-1})
40	2.3×10^7	2.0×10^7	87	5	0.24
80	2.9×10^7	2.7×10^7	93	5	0.24
120	3.1×10^7	2.9×10^7	93	5	0.24
160	3.2×10^7	2.9×10^7	90	5	0.27
200	3.4×10^7	3.0×10^7	88	5	0.25
Sans glucose	1.3×10^6	1.0×10^6	77	10	0.12

Tableau 7.2 Influence de l'addition de glucose et d'extrait de levure (40 mg/L) sur la croissance et la sporulation de Bt dans la boue de Black Lake (BLS).

Concentration de glucose (mg/L)	Compte total viable (UFC/mL)	Compte de spores (UFC/mL)	Pourcentage de sporulation (%)	Temps (jours)	μ_{\max} (h^{-1})
40	6.30×10^7	5.9×10^7	93	5	0.35
80	7.30×10^7	7.0×10^7	95	5	0.35
120	1.15×10^8	8.2×10^7	71	5	0.35
160	1.40×10^8	1.0×10^8	71	5	0.36
200	1.44×10^8	1.1×10^8	76	5	0.36
Sans glucose	1.3×10^6	1.0×10^6	77	10	0.12



Compte de spores dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) additionnée de 40 mg/L d'extrait de levure et différentes concentrations de glucose



Compte total dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) additionnée de 40 mg/L d'extrait de levure et différentes concentrations de glucose

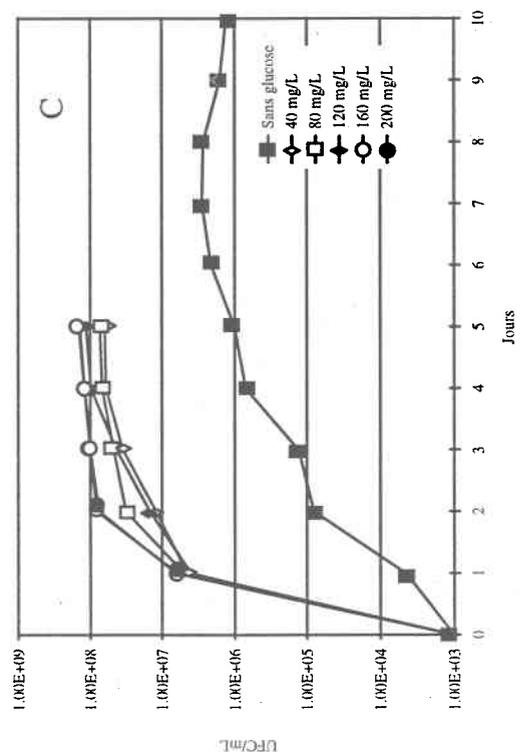


Figure 7.1 Influence de l'addition de nutriments sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis*.

7.2 Détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux

Les niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux obtenus par la culture de *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) ont été déterminés par la réalisation des bioessais. La technique utilisée pour la préparation de la diète employée dans ces expériences était la technique de contamination de la surface, décrite dans la partie 2.9.2.2 et les bioessais se sont déroulés selon ce qui est indiqué dans la section 2.9.3.

La procédure pour estimer le potentiel entomotoxique des produits obtenus est la même que celle déjà décrite, c'est-à-dire, la comparaison des pourcentages de mortalité des larves provoquée par le produit obtenu de chaque boue et du milieu farine de soja avec les pourcentages de mortalité provoquée avec la préparation commerciale Foray 48B. Les potentiels entomotoxiques des produits obtenus dans chaque série des expériences sont présentés dans les Tableaux 7.3 et 7.4 ainsi que leur activité relative par rapport aux niveaux de sporulation.

L'addition du glucose a augmenté le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Black Lake par rapport aux potentiels des complexes spores-cristaux obtenus dans la boue sans glucose. Il semble que l'addition de la plus faible concentration de glucose n'a eu aucun effet sur l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux puisque le potentiel entomotoxique est resté le même que dans la boue sans glucose, soit 3300 UI/ μ L, mais à mesure que la concentration de glucose a été augmentée dans la boue, le potentiel a commencé à s'élever pour atteindre 6600 UI/ μ L dans l'échantillon contenant 200 mg/L de glucose. En ajoutant à la boue 120 mg/L de glucose, le niveau d'entomotoxicité atteint a été le même que celui obtenu dans le milieu farine de soja, soit 3800 UI/ μ L. L'indice d'activité relative présente une certaine relation avec le potentiel entomotoxique pour les échantillons qui contiennent entre 80 mg/L et 200 mg/L de glucose, c'est-à-dire, que la

valeur de l'indice augmente à mesure que le potentiel augmente. Mais dans l'échantillon qui contient 40 mg/L de glucose, il est plus élevé ($165 \text{ UI}/10^3 \text{ spores}$) que dans les autres échantillons et cette situation s'explique parce que la concentration de spores était dans ce cas plus faible ($2 \times 10^7 \text{ UFC}/\text{mL}$). L'échantillon qui ne contient pas de glucose présente un potentiel entomotoxique presque identique à celui de l'échantillon de boue qui contient 40 mg/L de glucose ($3300 \text{ UI}/\mu\text{L}$) mais son indice d'activité relative est plus élevé ($3300 \text{ UI}/10^3$); cette différence est due au fait que le compte de spores dans cet échantillon a été beaucoup plus faible ($1 \times 10^6 \text{ UFC}/\text{mL}$) que dans l'échantillon contenant du glucose, d'où une valeur plus élevée de l'indice d'activité relative.

L'addition de l'extrait de levure dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) en plus du glucose a accru l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux par rapport aux niveaux trouvés en ajoutant seulement du glucose. Ainsi, déjà avec la plus basse concentration de glucose utilisée, soit 40 mg/L, le complexe spores-cristaux obtenu a une entomotoxicité de $3500 \text{ UI}/\mu\text{L}$, un peu plus élevée (6% de plus) que dans la boue sans glucose et les niveaux entomotoxiques des autres échantillons augmentent à mesure que la concentration du glucose s'élève dans la boue contenant l'extrait de levure. Pour les échantillons contenant 80 mg/L et 120 mg/L de glucose, les potentiels entomotoxiques atteints sont $4700 \text{ UI}/\mu\text{L}$ et $5300 \text{ UI}/\mu\text{L}$ respectivement ce qui représente une augmentation de 38% et de 39% par rapport aux valeurs trouvées sans l'addition de l'extrait de levure. C'est pour l'échantillon contenant l'extrait de levure et 160 mg/L de glucose que le pourcentage d'augmentation dans le potentiel entomotoxique par rapport aux échantillons sans l'extrait de levure est le plus élevé (45%), le complexe spores-cristaux obtenu a atteint $6400 \text{ UI}/\mu\text{L}$. Finalement, dans l'échantillon de boue contenant l'extrait de levure et 200 mg/L de glucose, *B. thuringiensis* a produit un complexe spores-cristaux avec un niveau entomotoxique de $6600 \text{ UI}/\mu\text{L}$, une augmentation de 24% dans le potentiel par rapport à l'échantillon contenant cette même concentration du glucose mais sans l'extrait de levure. Les échantillons qui contiennent la plus faible (40 mg/L) et la plus haute (200 mg/L) concentration de glucose présentent presque la même valeur d'activité relative (59 et $60 \text{ UI}/10^3 \text{ spores}$), mais leur potentiel entomotoxique est bien

différent (3500 UI/ μ L pour le première et 6600 UI/ μ L pour le deuxième). Dans ce cas il est intéressant de remarquer que le potentiel entomotoxique pour l'échantillon avec 200 mg/L de glucose a augmenté de 47% (6600 UI/ μ L) par rapport au potentiel présenté par l'échantillon avec 40 mg/L de glucose (3500 UI/ μ L); ce même pourcentage d'augmentation a été observé dans le compte de spores de l'échantillon avec 200 mg/L de glucose (1.1×10^8 UFC/mL) par rapport au compte dans l'échantillon avec 40 mg/L (5.9×10^7 UFC/mL) ce qui a fait que la valeur de l'indice soit presque le même dans les deux cas.

Tableau 7.3 Influence de l'addition de glucose sur le potentiel entomotoxique de Bt.

Concentration de glucose (mg/L)	Entomotoxicité (UI/ μ L)	Activité relative (UI/ 10^3 spores)
40	3300	165
80	3400	126
120	3800	131
160	4400	151
200	5300	176
Sans glucose	3300	3300

Tableau 7.4 Influence de l'addition de glucose et d'extrait de levure sur le potentiel entomotoxique de Bt.

Concentration de glucose (mg/L)	Entomotoxicité (UI/ μ L)	Activité relative (UI/10 ³ spores)
40	3500	59
80	4700	67
120	5300	65
160	6400	64
200	6600	60
Sans glucose	3300	3300

La Figure 7.2 montre l'influence de l'addition du glucose et de l'extrait de levure sur la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* dans la boue secondaire de Black Lake. Dans ce graphique les points qui correspondent aux différentes concentrations de glucose employées se trouvent du côté des concentrations de spores plus faibles qui sont en rapport avec les niveaux entomotoxiques moins élevés, tandis que tous les points qui correspondent aux expériences réalisées avec le glucose et l'extrait de levure présentent les concentrations de spores les plus élevées pour l'ensemble des échantillons et leur niveau entomotoxique est aussi élevée. Ce graphique montre qu'il existe une certaine relation entre la concentration des spores et le niveau entomotoxique déterminé dans les différents échantillons, de telle façon qu'il est possible d'espérer des niveaux entomotoxiques plus élevés si des quantités plus élevées de spores sont obtenues en ajoutant les nutriments manquants dans le milieu de culture, comme c'est le cas dans ces expériences.

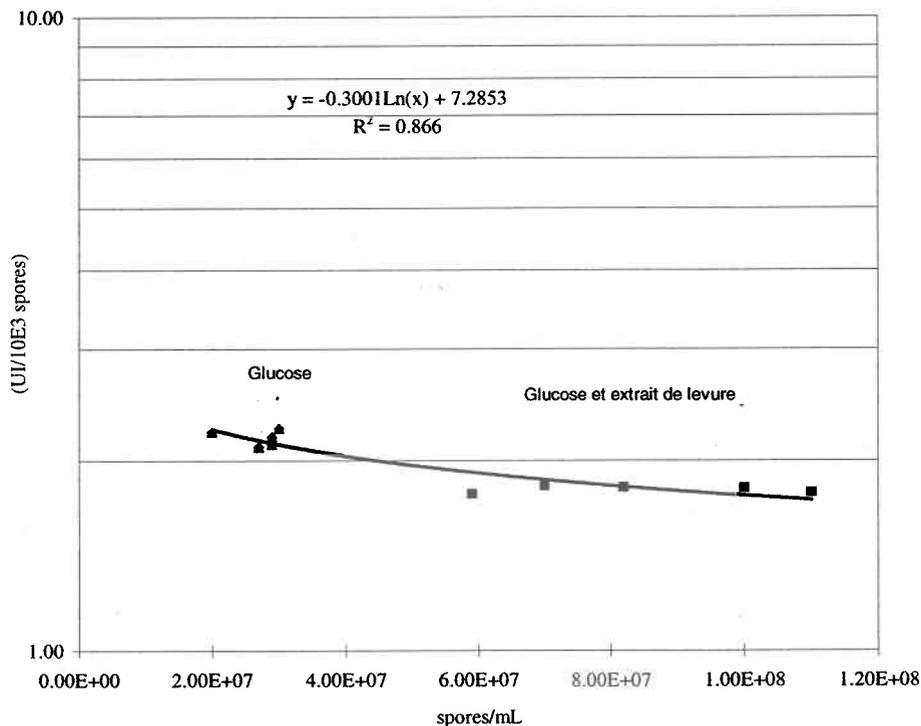


Figure 7.2 Influence de l'addition de nutriments sur l'indice d'activité relative de Bt.

7.3 Discussion

Plusieurs études ont été faites pour évaluer l'influence des conditions et de la composition du milieu de culture sur l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par *B. thuringiensis* (Avignone-Rossa et Mignone, 1993; Yudina *et al.*, 1993; Kuppusamy et Balaraman, 1991; Sikdar *et al.*, 1993; Selinger *et al.*, 1988; Pearson et Ward, 1988; Mummigatti et Raghunathan, 1988; Lavrikova *et al.*, 1992; Moraes *et al.*, 1980; Avignone-Rossa *et al.*, 1990; Singer et Rogoff, 1968). Une bonne croissance et une

bonne sporulation sont nécessaires pour obtenir un bon niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par cette bactérie (Kang *et al.*, 1992).

Dans les expériences décrites dans ce chapitre, l'addition d'une source de carbone dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) a eu un effet positif pour la fermentation de *B. thuringiensis*. Premièrement, les temps nécessaires pour l'obtention du complexe spores-cristaux ont diminué (5 jours), les niveaux de sporulation de la bactérie et le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux obtenus par rapport au résultats obtenus avec la boue comme telle ont augmenté. L'addition de glucose à cinq différentes concentrations a fait augmenter les quantités produites de spores au fur et à mesure que la concentration de glucose a été augmentée, situation semblable à celle trouvée par Su et Hwang (1992) qui en variant la concentration de glucose dans leur milieu de culture ont remarqué une élévation de la quantité de spores en augmentant la concentration de glucose. Les niveaux entomotoxiques des complexes spores-cristaux suivent la même tendance. Ils augmentent à mesure que la concentration de glucose augmente. Le glucose a donc joué un rôle important dans la croissance, la sporulation et la formation de cristaux en utilisant la boue secondaire comme milieu de culture, situation similaire à celle trouvée par Scherrer *et al.* (1973) qui en variant la concentration de glucose dans un milieu synthétique avaient trouvé que le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux varie avec la concentration de glucose.

L'addition d'une source additionnelle d'azote (de l'extrait de levure qui contient aussi des vitamines) en plus du glucose a amélioré les quantités obtenues de spores dans les cinq échantillons de boue employés, même si les pourcentages de sporulation dans trois d'entre elles ont diminué par rapport au pourcentage quand la boue contenait seulement du glucose. Malgré la diminution dans les pourcentages de sporulation, les complexes spores-cristaux obtenus ont augmenté leur potentiel entomotoxique dans des pourcentages qui fluctuent entre 6% et 45%. Évidemment, ces expériences montrent que même si la concentration de l'extrait de levure employée était faible, elle a contribué à améliorer la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis*

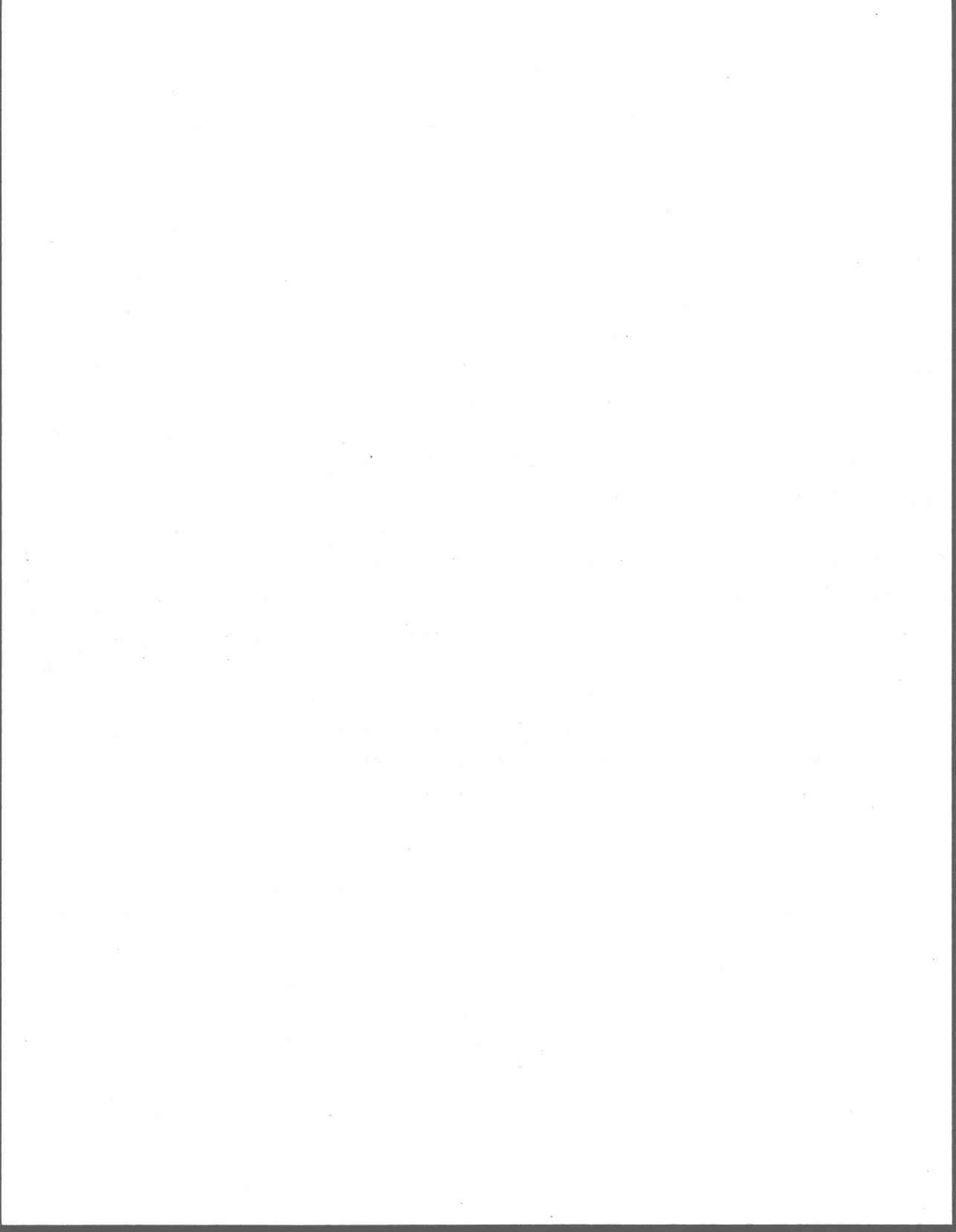
(Bernhard et Utz 1995), probablement parce qu'elle contient des éléments déficients dans la boue et qui encouragent la sporulation et la production de la δ -endotoxine.

Kang *et al.*, (1992) et Pearson et Ward (1988) indiquent qu'une bonne croissance et une bonne sporulation de *B. thuringiensis* dans le milieu de culture employé permettent d'obtenir des bons potentiels entomotoxiques du complexe spores-cristaux. Les expériences réalisées avec l'addition du glucose et de l'extrait de levure indiquent que leur présence dans la boue a aidé à améliorer la croissance et la sporulation de la bactérie par rapport aux résultats trouvés dans cette même boue sans ces nutriments. En effet, dans les échantillons contenant seulement du glucose, la croissance et la sporulation a augmenté au fur et à mesure que la concentration de glucose a augmenté et cette même tendance se présente dans les échantillons contenant en plus l'extrait de levure. Mais dans ces derniers la présence de l'extrait de levure les a fait augmenter beaucoup plus. L'extrait de levure, qui contient des protéines et des vitamines, probablement a rempli quelques besoins physiologiques de *B. thuringiensis* que la boue secondaire de Black Lake ne contenait pas.

Ces expériences ont montré qu'en variant la composition de la boue secondaire de Black Lake (BLS) par l'apport de sources additionnelles de carbone et d'azote, la performance de la boue pour soutenir la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par *B. thuringiensis* peut être améliorée. Mais il est important de mentionner que même si le niveau entomotoxique des complexes spores-cristaux a été accru, les valeurs trouvées ne peuvent pas se comparer aux valeurs du complexe spore-cristaux produit par *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière sans apport du glucose ni d'extrait de levure. Alors, probablement, il serait possible d'augmenter le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux produit par cette bactérie dans la boue de Jonquière additionnée de ces nutriments.

Dulmage (1970b) a mentionné que la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* doit être envisagée principalement comme un problème de fermentation étant donné que

le niveau entomotoxique des cristaux produits par la bactérie dépend de la souche et des conditions de fermentation (milieu de culture, pH, température, aération). Il est très important d'envisager qu'il peut y avoir des boues d'épuration pouvant performer mieux que d'autres ou qu'il est nécessaire de trouver les conditions de fermentations les plus convenables pour chacune des boues, de façon à sélectionner celles qui donneront les meilleurs résultats au niveau du potentiel entomotoxique.



8. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE *B. thuringiensis* HD-1

La recherche d'un milieu de culture efficace et économique pour augmenter la production de *B. thuringiensis* s'avère d'une grande importance surtout parce que ce bacille représente une alternative plus écologique pour le contrôle de divers insectes nuisibles. La production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* peut varier non seulement parmi les sérotypes mais aussi à cause du milieu de culture utilisé et des conditions employées (Dulmage, 1970b; Mummigatti et Raghunathan, 1990). Il est possible d'obtenir une bonne activité entomotoxique des cristaux dans différents milieux de culture (Salama *et al.*, 1983c; Ejiofor et Okafor, 1989) ou même pas d'activité comme le démontrent les expériences réalisées avec l'eau de noix de coco employée comme milieu alternatif par Fernandez *et al.* (1975). Donc un milieu de culture doit permettre la croissance, la sporulation et ce qui est plus important, la production de la δ -endotoxine qui confère leur caractère entomopathogène aux complexes spores-cristaux produits par *B. thuringiensis*.

L'activité insecticide des cristaux produits par *B. thuringiensis* est contrôlée par cinq différentes familles de gènes appelées *cry*, composées elles-mêmes de sous-familles. À chacune correspond une famille de δ -endotoxines ou protéines Cry et un pathotype (Rjanchapel-Messaï, 1993). Ces gènes codent la synthèse de différents types d'endotoxines ce qui donne à *B. thuringiensis* la capacité d'agir contre une grande gamme d'insectes (Venugopal *et al.*, 1992). La famille à laquelle un gène appartient dépend de la séquence des acides aminés et de son entomotoxicité vis-à-vis les lépidoptères, diptères ou coléoptères (Broadwell, 1994). Les gènes les mieux caractérisés se trouvent dans la famille *CryI* et ils codent pour des protéines de poids moléculaires d'environ 130 kDa. Ces protéines sont des protoxines qui clivées par des protéases intestinales, libèrent un fragment toxique pour les insectes cibles (Rajchapel-Messaï, 1993).

Ce chapitre présente les résultats obtenus sur la caractérisation génétique de *B. thuringiensis* var *kurstaki* HD-1, afin de vérifier la présence de gènes responsables de l'activité bioinsecticide des cristaux produits par cette souche cultivée dans les boues d'épuration. À ce propos, chez *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, l'activité entomotoxique des cristaux est due aux endotoxines codées par les gènes CryIA(a), CryIA(b) et Cry(c) (Höfte et Whiteley, 1989) et c'est donc la présence de ces trois gènes qui a été vérifiée dans des échantillons de ce bioinsecticide produit à partir de boues d'épuration.

8.1 Préparation des échantillons

Les échantillons des boues du Tableau 2.1 ont été employés pour la réalisation de ces expériences avec ou sans prétraitement (hydrolyse), sauf la boue de Jonquière qui a été employée sans prétraitement. Les échantillons ont été traités selon ce qui est décrit dans la section 2.10.2 afin d'obtenir l'ADN nécessaire pour les amplifications.

8.2 Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN a été réalisée à l'aide des amorces sélectionnées selon les séquences des gènes qui codent pour la δ -endotoxine. Une paire d'amorces spécifiques pour chacun des trois gènes CryIA a été utilisée dans chaque amplification PCR. La Figure 8.1 est une représentation schématique des gènes CryIA et les positions des cinq amorces dans les séquences des trois gènes connus chez *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Le Tableau 8.1 montre les caractéristiques des amorces utilisées.

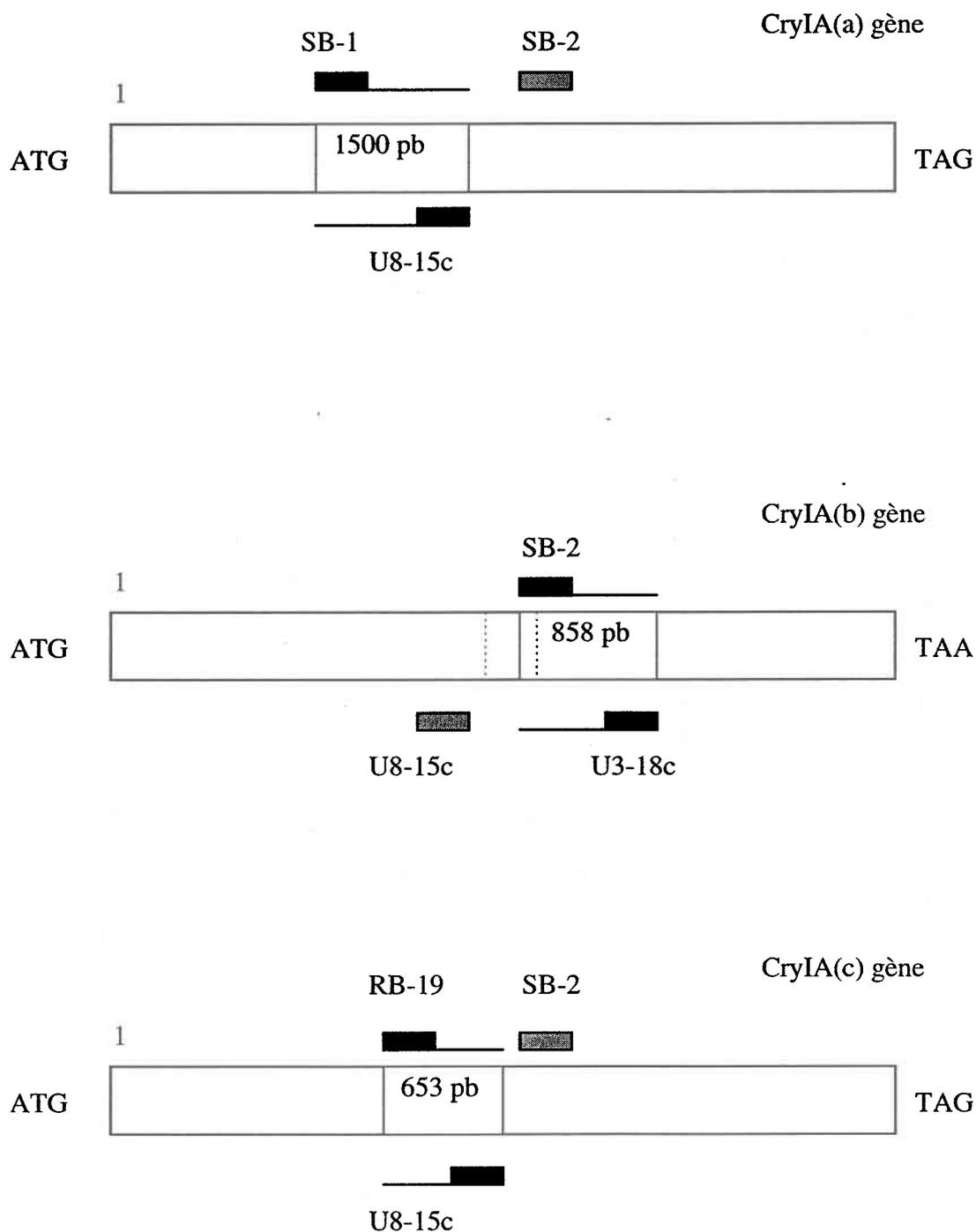


Figure 8.1 Représentation schématique des gènes CryIA et position des amorces utilisés

Tableau 8.1 Caractéristiques des amorces utilisées pour l'identification des gènes CryIA.

Amorce	Produit de la PCR	Séquence	Position	Référence
SB-1	CryIA(a) gène du HD-1	5'-TGCATAGAGGCTTTAAT-3'	925-941	Schnepf <i>et al.</i> , 1985
SB-2	CryIA(b) gène du NRD-12	5'-TCGGAAAATGTGCCCAT-3'	2375-2391	Hefford <i>et al.</i> , 1987
RB-19	CryIA(c) gène du HD-73	5'-GGGACTGCAGGAGTGAT-3'	1779-1795	Prefontaine <i>et al.</i> , 1987; Adang <i>et al.</i> , 1985
U3-18c	CryIA(b) gène du NRD-12	5'-AATTGCTTTCATAGGCT-3'	3215-3231	Prefontaine <i>et al.</i> , 1987; Hefford <i>et al.</i> , 1987
U8-15c	CryIA(a) gène du HD-1	5'-CAGGATTCCATTCAAGG-3'	2408-2424	Schnepf <i>et al.</i> , 1985

Les amplifications ont été réalisées selon ce qui est décrit dans la section 2.10.3. Les échantillons ont été introduits dans l'appareil "DNA thermal cycler" préchauffé à 94 °C et programmé selon les cycles indiqués dans le Tableau 2.2 de la section 2.10.3. et l'analyse de l'ADN obtenu a été réalisée suivant ce qui est décrit dans la section 2.10.4.

8.3 Résultats

8.3.1 Échantillons amplifiés

L'ADN correspondant au premier et aux trois derniers jours de la fermentation a été analysé et ce, pour chacune des boues. Au total, 56 échantillons ont été testés pour chaque paire d'amorces utilisées et trois paires d'amorces ont été employées pour identifier chacun des gènes qui codent pour la δ -endotoxine chez *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1.

8.3.2 Identification des gènes CryIA dans les cultures de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 obtenues à partir des boues d'épuration

Les amorces SB-1 et U8-15c spécifiques pour le gène CryIA(a) permettent d'obtenir un produit d'amplification de 1500 pb. Les amorces SB-2 et U3-18c spécifiques pour le gène CryIA(b) permettent d'obtenir un produit d'amplification de 858 pb et finalement, les amorces RB-19 et U8-15c spécifiques pour le gène CryIA(c) permettent d'obtenir un produit d'amplification de 653 pb (Bourque *et al.*, 1993).

Les produits d'amplification obtenus ont été facilement identifiés en le faisant migrer sur un gel d'agarose sous un champ électrique. Les trois bandes qui correspondent au profil produit par l'ADN de cette souche peuvent être clairement reconnues dans le gel de cette façon. Le Tableau 8.2 montre les résultats obtenus avec chaque échantillon de boue sans prétraitement et le Tableau 8.3 pour les boues avec prétraitement. Toutes les boues ont présenté les trois bandes caractéristiques des gènes codant pour l'entomotoxicité chez *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1.

Tableau 8.2 Résultats des amplifications dans les boues sans prétraitement.

Boue	Échantillon	Produit de 1500 pb	Produit de 858 pb	Produit de 653 pb
Black Lake (BLS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Black Lake digérée (BLDS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Sainte Claire (SCS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Beauceville (BVS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Pâtes et papiers, réacteur en membranes (PPRMS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Jonquière (JS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI

Tableau 8.3 Résultats des amplifications dans les boues avec prétraitement.

Boue	Échantillon	Produit de 1500 pb	Produit de 858 pb	Produit de 653 pb
Valcartier (ValP)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Black Lake (BLS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Black Lake digérée (BLDS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Sainte Claire (SCS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Beauceville (BVS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Secondaire de l'usine de pâtes et papiers (PPS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI
Pâtes et papiers , réacteur en membranes (PPRMS)	1	OUI	OUI	OUI
	2	OUI	OUI	OUI
	3	OUI	OUI	OUI
	4	OUI	OUI	OUI

La Figure 8.2 présente les résultats de l'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* obtenu dans la boue de Beauceville prétraitée (hydrolysée) pour le premier et dernier jour de fermentation. Sur cette figure la bande 1 est l'échelle de 1 Kb et les bandes 2, 3 et 4 correspondent aux produits d'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 inoculé dans le milieu TSBY et qui a été utilisé pour identifier les bandes produits normalement par la bactérie. La bande 5 montre le produit d'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* (obtenu par fermentation dans la boue) correspondant à 1500 pb, la bande 6 le produit d'amplification de 858 pb et la bande 7 le produit d'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* correspondant à 653 pb (échantillon du premier jour). La bande 8 montre le produit de l'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* correspondant à 1500 pb; la bande 9 représente le produit d'amplification de l'ADN de *B. thuringiensis* correspondant à 858 pb et la bande 10 le produit de l'amplification de l'ADN correspondant à 653 pb pour la même boue (échantillon du dernier jour); ce même profil s'est présenté pour les échantillons du deuxième et troisième jours de cette boue. La migration des produits d'amplification de l'ADN obtenu à partir des premiers et derniers échantillons des autres boues ont présenté les mêmes résultats, soit les bandes qui correspondent aux mêmes poids moléculaires présentés dans la Figure 8.2.

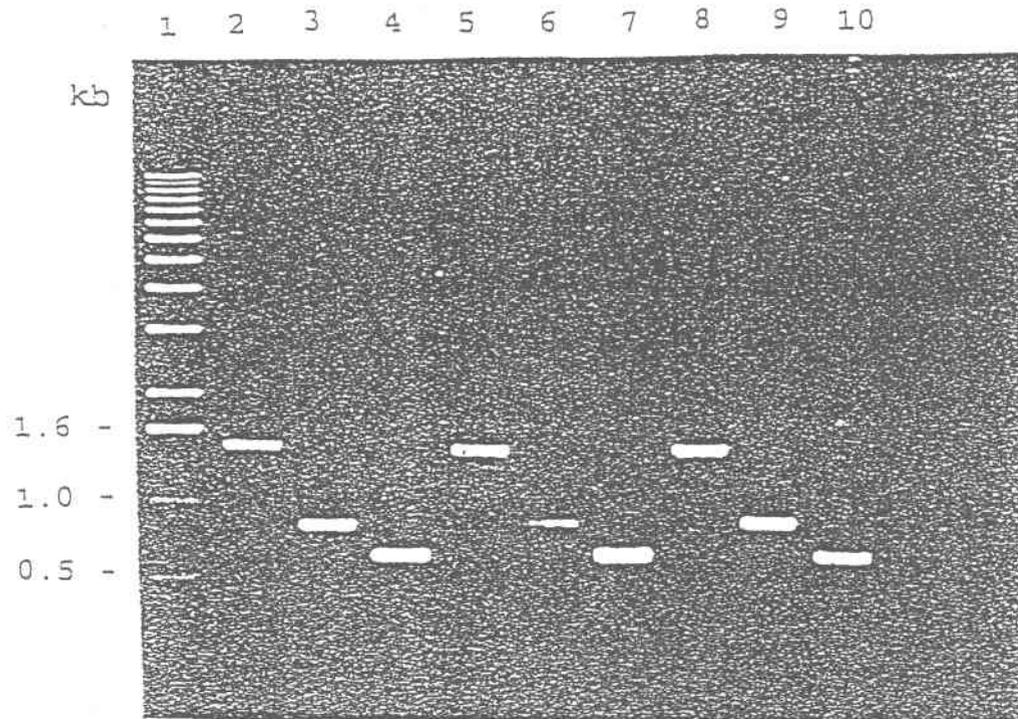


Figure 8.2 Produits d'amplification de la boue de Beauceville avec prétraitement.

Il a été constaté que les produits d'amplification obtenus avec les boues correspondent aux mêmes bandes obtenues avec la soucheensemencée dans le milieu TSBY. En effet, les produits des amplifications de l'ADN extrait des cultures de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 obtenues de fermentations réalisées en utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture, révèle la présence des trois gènes Cry qui, chez cette bactérie, codent pour l'activité entomotoxique des cristaux.

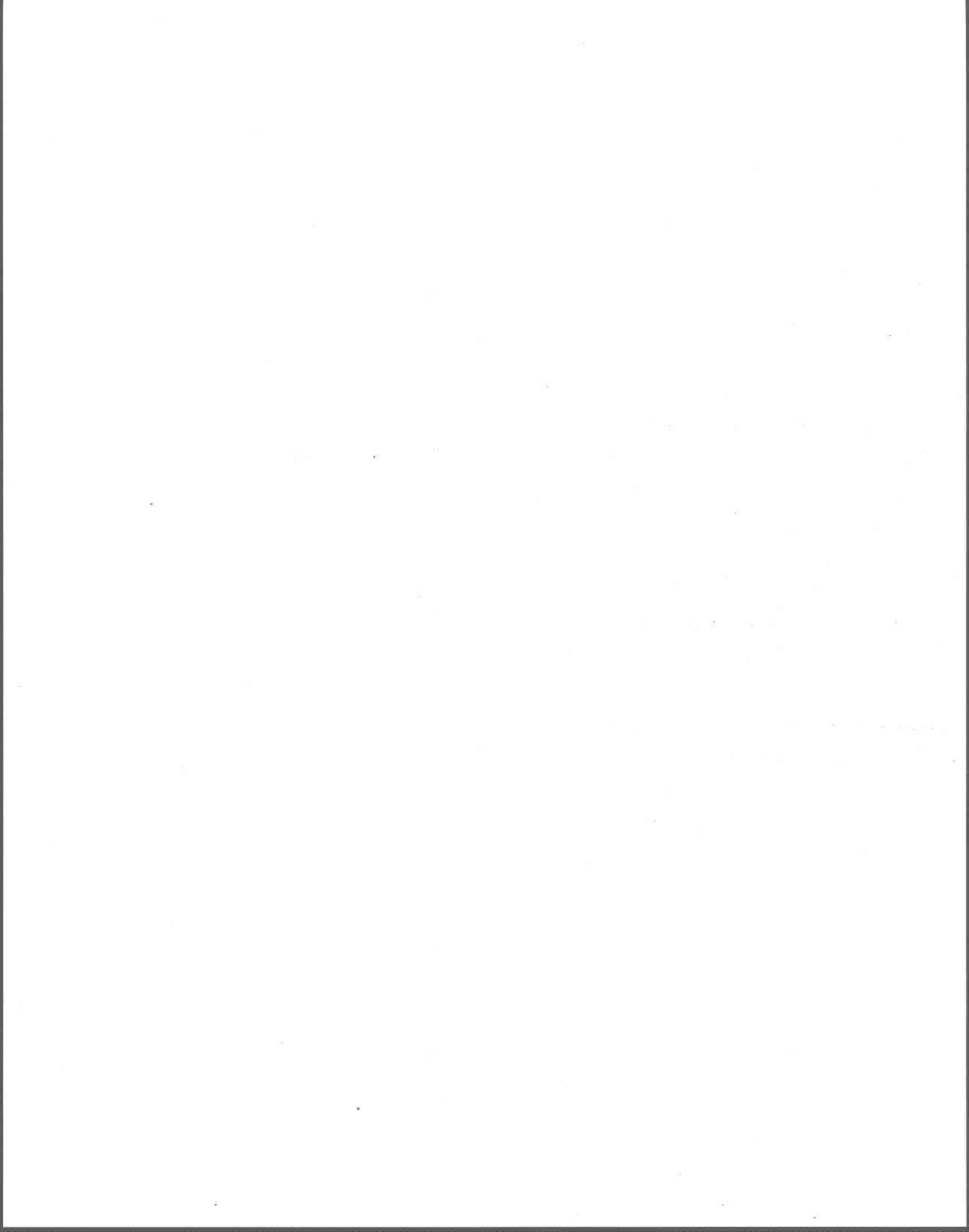
8.4 Discussion

L'élément qui donne le potentiel entomotoxique aux préparations de *B. thuringiensis* sont les cristaux produits par la bactérie pendant la phase de sporulation (Sarjeet *et al.*, 1992; Attathom *et al.*, 19995). L'activité entomotoxique de ces cristaux produits chez *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 est codée par des gènes CryIA(a), CryIA(b) et CryIA(c) (Höfte et Whiteley, 1989; Préfontaine *et al.*, 1987).

Les résultats obtenus dans cette partie de la recherche révèlent que *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 peut être cultivé dans les boues d'épuration sans voir affectées ses caractéristiques génétiques au niveau des gènes CryIA. En effet, les amorces utilisées pour identifier les gènes CryIA chez cette bactérie ont permis d'identifier spécifiquement chacun des gènes codant pour l'entomotoxicité. Ainsi, tous les produits des amplifications de l'ADN extrait des cultures de cette bactérie obtenues de fermentations réalisées en utilisant les boues d'épuration révèlent la présence des trois gènes CryIA.

La technique de la polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) est rapide et en utilisant les amorces adéquates, elle pourrait être utilisée comme un moyen de dépistage de *B. thuringiensis* obtenu dans les milieux alternatifs afin de connaître s'ils possèdent les gènes qui codent pour la toxicité des cristaux. Ceci permettrait donc d'avoir une idée de la capacité entomotoxique des cultures obtenus dans différents milieux avant même la réalisation des bioessais.

Les résultats de cette partie de la recherche s'avèrent d'une grande importance étant donné qu'ils démontrent une grande stabilité des gènes codant pour les protéines entomotoxiques chez *B. thuringiensis*, et ce, après un passage dans un milieu de culture alternatif si complexe telles que les boues d'épuration.



9. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les différentes recherches réalisées pour trouver un milieu de culture moins cher que les substrats habituels et pouvant soutenir la croissance, la sporulation et la production de la δ -endotoxine par *B. thuringiensis* ont été principalement orientées vers la réutilisation de sous-produits agroindustriels. La présente recherche a été axée sur la réutilisation d'un sous-produit qui à première vue ne semble pas approprié à cette fin: les boues d'épuration. Les résultats des travaux présentés dans les chapitres précédents ont donc permis de mettre en évidence que les boues d'épuration constituent un substrat qui peut être employé pour la production de ce bioinsecticide. Ainsi, en plus de donner une autre option pour la réutilisation des boues d'épuration, leur emploi comme milieu de culture peut contribuer à réduire les coûts d'obtention de ce bioinsecticide, ce qui est le but principal des recherches réalisées pour trouver un milieu de culture moins cher pour sa production.

La caractérisation des huit boues employées dans ces expériences a montré qu'elles contiennent des éléments pouvant soutenir la croissance et la sporulation de *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1. Entre eux se trouvent le carbone, l'azote, des éléments minéraux comme le calcium et le magnésium, ainsi que divers ions métalliques qui sont nécessaires pour le développement de la bactérie. Mais il n'a pas été possible d'établir un lien entre les caractéristiques de chacune des boues et les niveaux de croissance, de sporulation et le potentiel entomotoxique obtenu. Il serait donc important de réaliser une caractérisation plus approfondie, en analysant d'autres paramètres, comme par exemple le contenu en acides aminés qui semble avoir beaucoup d'influence sur le développement de la bactérie.

L'utilisation de boues comme telles ou avec prétraitement et l'utilisation des surnageants a affecté la croissance, la sporulation et la production de δ -endotoxine par *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1. En général, quand les boues ont été employées après le prétraitement d'hydrolyse, les potentiels entomotoxiques étaient plus élevés en

comparaison avec les résultats obtenus avec les boues sans prétraitement ou avec les surnageants. L'hydrolyse a même permis l'utilisation de la boue primaire de Valcartier (ValP) comme milieu de culture, qui sans ce prétraitement n'est pas capable de soutenir la croissance de la bactérie. Probablement, l'ajustement du pH réalisé pendant l'hydrolyse en fait un milieu approprié pour la croissance de la bactérie. L'utilisation des surnageants ne semble pas recommandable en raison de faibles potentiels entomotoxiques obtenus dans les complexes spores-cristaux.

Les expériences réalisées avec différentes températures de fermentation ont montré qu'effectivement, la croissance de *B. thuringiensis* est affectée par les températures de 34 °C et 36 °C. En effet, pour tous les pH essayés, les comptes totaux finaux viables de la bactérie à ces températures sont inférieurs aux comptes obtenus à 30 °C et à 32 °C. La croissance a été plus lente à 34 °C et 36 °C comme le montrent les taux spécifiques de croissance qui pour l'ensemble des échantillons ont varié entre 0.02 et 0.05 h⁻¹, à ces températures. Le potentiel entomotoxique a été plus affecté à 36 °C; il a varié de 3500 UI/μL au pH=6 et 5200 UI/μL au pH=2, en comparant avec le potentiel plus élevé trouvé à 32 °C et pH=7 et qui était de 7300 UI/μL. Les expériences réalisées en utilisant différents pH d'hydrolyse n'ont pas permis d'établir un lien précis entre le niveau d'hydrolyse donné initialement aux échantillons et le potentiel entomotoxique déterminé dans les complexes spores-cristaux obtenus. Mais il est important d'indiquer que probablement, certaines boues n'ont pas besoin d'un prétraitement d'hydrolyse avant d'être inoculées avec *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1, comme c'est le cas de la boue de Jonquière où le potentiel entomotoxique déterminé en utilisant la boue sans prétraitement a été beaucoup plus élevé que dans le milieu de référence (farine de soja). Donc, il serait possible de tester les boues au pH original, sauf s'il s'agit des boues primaires, sans réaliser l'hydrolyse, en réduisant ainsi les coûts que l'apport de réactifs pourrait signifier. Il serait recommandable de réaliser les fermentations avec un pH initial de 7 et à une température entre 30 °C et 32 °C.

Le contrôle du pH près de la neutralité pendant la fermentation avec des solutions tampon a eu un impact bénéfique sur le pourcentage de sporulation et le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux. En effet, sans contrôle du pH, le pourcentage de sporulation trouvé dans la boue de Jonquière était de 80%, tandis qu'avec les solutions tampon, il a varié entre 90% (tampon PBS) et 94% (tampon TRIS). L'effet bénéfique du contrôle du pH a été plus significatif sur le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux. Ainsi, sans contrôle du pH, le potentiel était de 7200 UI/ μ L, tandis qu'il était de 10100 UI/ μ L avec l'addition du tampon PBS et de 10500 UI/ μ L avec le tampon TRIS. Il semble donc très important en utilisant les boues d'épuration de contrôler le pH près de la neutralité pendant la fermentation de *B. thuringiensis*, ce qui peut se réaliser plus efficacement dans un fermenteur.

Le choc thermique appliqué après la phase de croissance exponentielle de *B. thuringiensis* n'a pas eu un effet sur la performance de la bactérie; la sporulation et le potentiel entomotoxique n'ont pas varié. Il serait intéressant de tester une réduction plus drastique de la température après la phase de croissance exponentielle ou même un choc du pH afin de promouvoir la sporulation et en conséquence une augmentation du complexe spores-cristaux.

Un facteur qui semble avoir une importante influence sur les mécanismes de croissance et de production du complexe spores-cristaux est l'agitation. En effet, quand les échantillons ont été agités à 50 rpm, *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 a montré une faible croissance et production de δ -endotoxine. Les pourcentages de sporulation ont varié sous cette agitation entre 15% et 16%, tandis que le potentiel entomotoxique déterminé dans les complexes spores-cristaux obtenus des échantillons sans contrôle du pH et avec contrôle du pH étaient de 3400 UI/ μ L et 5300 UI/ μ L. En augmentant l'agitation à 150 rpm, les pourcentages de sporulation ont augmenté à plus de 70% et les potentiels entomotoxiques se sont aussi accrus, mais surtout dans l'échantillon avec contrôle du pH où le potentiel était de 9300 UI/ μ L. Les pourcentages de sporulation sous un régime de 250 rpm était de 80% pour la boue de Jonquière sans solution tampon et de 94% pour

l'échantillon de cette même boue additionnée du tampon TRIS. Les potentiels entomotoxiques présentent les valeurs les plus élevées pour chacun des échantillons, soit 7100 UI/ μ L pour l'échantillon de boue sans tampon et 10000 UI/ μ L pour l'échantillon avec la solution tampon. Le niveau d'agitation ne peut être augmenté indéfiniment comme le montrent les résultats obtenus à 350 rpm, où les potentiels entomotoxiques retrouvés dans les échantillons sont plus faibles par rapport à ceux obtenus à 250 rpm. Probablement, un excès d'oxygène dans le milieu a eu comme résultat d'inhiber la production de la δ -endotoxine, donc le niveau d'agitation recommandé pour faire les fermentations avec les boues serait de 250 rpm. La réalisation des expériences semblables dans un fermenteur, où les conditions d'aération peuvent être plus contrôlées pourrait clarifier ce point. Dans ces expériences le contrôle du pH dans les échantillons pendant la fermentation à l'aide de la solution tampon TRIS a une influence positive sur le potentiel entomotoxique des complexes spores-cristaux par rapport aux valeurs obtenues dans les échantillons sans contrôle du pH quand les niveaux d'agitation étaient de 150, 250 et 350 rpm. Ce qui est évident, comme il a été déjà établi dans un paragraphe précédent, c'est qu'il est important de contrôler le pH pendant la culture de *B. thuringiensis* dans les boues d'épuration si de bons résultats sur le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux sont désirés.

L'addition de sources de nutriments dans la boue secondaire de Black Lake (BLS) a eu un effet positif sur la croissance et la production du complexe spores-cristaux de *B. thuringiensis*. Ainsi, en ajoutant du glucose, les pourcentages de sporulation ont augmenté par rapport à celui de la boue sans l'addition de ce supplément, ils varient entre 87% et 90%. Les potentiels entomotoxiques ont augmenté de 3300 UI/ μ L sans l'addition du glucose à 5300 UI/ μ L avec la concentration de glucose la plus élevée (200 mg/L) dans ces expériences. L'effet de l'addition du glucose et de l'extrait de levure dans la boue secondaire de Black Lake se révèle dans les potentiels entomotoxiques des complexes spores-cristaux qui ont augmenté entre 6% et 45% par rapport aux potentiels trouvés dans les échantillons contenant seulement du glucose. Donc, il est possible d'augmenter considérablement le potentiel du complexe spores-cristaux obtenu en utilisant les boues

d'épuration comme milieu de culture, en l'enrichissant avec certains suppléments nutritifs.

Les résultats de cette étude ont montré qu'aucun changement, au niveau des gènes codant pour le potentiel entomotoxique, s'est présenté dans l'ADN de *B. thuringiensis* obtenu en utilisant les boues d'épuration pour sa culture. En effet, la bactérie s'est développée normalement dans toutes les boues d'épuration de différents types et origines testées. Dans l'ADN obtenu à partir de *B. thuringiensis* cultivé sur les boues, les trois gènes CryIA qui codent pour l'entomotoxicité ont été identifiés avec l'aide de la polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant des amorces spécifiques. Les boues d'épuration peuvent donc être employées en toute sécurité comme milieu de culture pour *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 sans affecter la stabilité génétique en ce qui concerne ces trois gènes. Leur expression pendant la phase de croissance exponentielle avait déjà été indiquée par les résultats des analyses réalisées pour détecter la production de l'antigène du cristal pendant cette phase (Kanda, 1987), mais le développement de l'entomotoxicité au cours de la fermentation n'avait pas encore été présenté. Ainsi les courbes du développement de l'entomotoxicité déterminées dans cette étude montrent qu'effectivement les gènes CryIA commencent à s'exprimer pendant la phase de croissance exponentielle car, même si les valeurs d'entomotoxicité sont faibles dans les échantillons de cette phase, il y a déjà du potentiel entomotoxique et une fois que la phase de sporulation a été amorcée, le potentiel entomotoxique commence à atteindre une valeur stable. Ces résultats confirment le fait que *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1 se développe normalement dans les boues d'épuration. Il serait intéressant d'utiliser les boues d'épuration pour la culture d'autres souches de *B. thuringiensis* étant donné que déjà avec la souche utilisée dans ces expériences les résultats sont encourageants.

L'utilisation de *B. thuringiensis* est une alternative plus écologique face à l'utilisation des pesticides chimiques. Un usage plus répandu de cet insecticide biologique est donc souhaitable pour le contrôle des insectes ravageurs des produits agricoles, forestiers ou qui sont vecteurs de maladies. Mais son utilisation a été restreinte surtout à cause des

coûts de production. Le prix du milieu de culture employé dans l'obtention de ce bioinsecticide représente une partie importante des coûts de production. Il est donc important de disposer d'un substrat plus économique que ceux employés actuellement. Les expériences réalisées dans cette étude ont montré que les boues d'épuration sont un substrat capable de soutenir la croissance, la sporulation et la production de δ -endotoxine par *B. thuringiensis* variété *kurstaki* HD-1. En plus, elles sont disponibles et de coût réduit, pouvant ainsi favoriser la production de ce bioinsecticide dans des endroits où elle est maintenant limitée par des raisons économiques.

Les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus à l'échelle du laboratoire. Il serait recommandable de réaliser des expériences dans un fermenteur et même tester avec d'autres souches de *Bacillus thuringiensis*. En effet, les différents paramètres de fermentation (pH, oxygénation, agitation, température), peuvent être systématiquement contrôlés dans un bio-réacteur, ce qui peut permettre d'obtenir des meilleurs résultats lors de la multiplication de *B. thuringiensis*, surtout au niveau du potentiel entomotoxique. Ceci permettrait d'évaluer les possibilités réelles de l'emploi des boues d'épuration pour la production industrielle de *B. thuringiensis*.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Hameed, A., G. Carlberg et O. M. El-Tayeb (1990). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-III. Selection of media for δ -endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7:231-236
- Abdel-Hameed, A., G. Carlberg et O. M. El-Tayeb (1991). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-IV. Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7:231-236.
- Abdel-Hameed, A. (1992). Effect of amino acids in defined media on growth of *Bacillus thuringiensis* H-14. *Acta Pharmaceutica Fennica*, 101:221-226.
- Abrosimova, L. I., P. V. Babaeva, G. M. Zubareva et V. V. Shevtsov (1986). Influence of mineral salts on the level of exotoxin production and productivity of a culture of *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya*, 55(3):440-444.
- Akpoboua, L. K. B., P. Guillet, D. C. Kurtak et P. Pangalet (1989). Le rôle du *Bacillus thuringiensis* H-14 dans la lutte contre *Simulium damnosum* (Diptera :Simulidae), vecteur de l'onchocercose en Afrique occidentale. *Naturaliste Canadien* (Rev. Eco. Sys.), 116:167-174.
- APHA, AWWA ET WPCF (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters*. 17 ième édition. American Public Health Association, Washington, D. C., U.S.A.
- Arcas, J., O. M. Yantorno, E. Arrarás et R. J. Ertola (1984). A new medium for growth and δ -endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*. *Biotechnology Letters*, 6:405-410.
- Arcas, J., O. M. Yantorno et R. J. Ertola (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters*, 9:105-110.
- Aronson, J. N., D. P. Borris, J. F. Doerner et E. Akers (1975). γ -aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology*, 30:489-492.
- Aronson, J. N. (1976). Ammonia assimilation and glutamate catabolism by *Bacillus thuringiensis*. Dans: D. Schlesinger (éd) *Microbiology-1976*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 444-449.

- Aronson, J. N., D. J. Tyrell, P. C. Fitz-James et L. A. Bulla Jr (1982). Relationship of the syntheses of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 151(1): 399
- Aronson, A. I., W. Beckman et P. Dunn (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, March:1-24.
- Attathom, T., W. Chongrattanameteeikul, J. Chanpaisant et R. Siriyan (1995). Morphological diversity and toxicity of delta-endotoxin produced by various strains of *Bacillus thuringiensis*. *Bulletin of Entomological Research*, 85:167-173.
- Avignone-Rossa, C., O. M. Yantorno, J. A. Arcas et R. J. Ertola (1990). Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Technology*, 6:27-31.
- Avignone-Rossa, C., J. A. Arcas et C. F. Mignone (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:301-304.
- Avignone-Rossa, C. and C. Mignone (1993). δ -endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 15:(3), 295-300.
- Avignone-Rossa, C. et C. F. Mignone (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. *Molecular Biotechnology*, 4:55-71
- Baldwin, A., T. A. Brown, P. H. T. Beckett et G. E. P. Elliot (1983). The forms of combination of Cu and Zn in digested sewage sludge. *Water Resources*, 17:1935-1944.
- Beegle, C. C. (1990). Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Dans: *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*. U.S.A. American Chemical Society, p. 14-21.
- Bernhard, K. et R. Utz (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. Dans: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. (éds), *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and practice*. Great Britain, John Wiley & sons, p. 255-267.
- Bibilos, M. et R. E. Andrews Jr. (1988). Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translations. *Canadian Journal of Microbiology*, 34:740-747.

- Black, K. G. et S. J. Snyman (1991). Biomass yield and insecticidal activity of a local *Bacillus thuringiensis* isolate in six fermentation media. *Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association*. June:77-79.
- Blais, J. F., R. D. Tyagi et J. C. Auclair (1993). Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth kinetics. *Water Research*, 27(1):101-110.
- Borris, D. P. et J. N. Aronson (1969). Relationship of L-alanine and l-glutamate dehydrogenases of *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 191:716-718.
- Bourque, S. N., J. R. Valéro, J. Mercier, M. C. Lavoie et R. C. Levesque (1993). Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2):523-527.
- Bowen, P. T., J. E. Hendrick, T. A. Woodward, L. S. Mitchell et M. Lahlou (1989). Sludge treatment, utilization and disposal. *Journal Water Pollution Control Federation*, 61:821-829.
- Bradley, J. W., S. Kyosai, P. Matthews, K. Sato et M. Webber (1992). Worldwide sludge management practices. Dans: C. Lue-Hing, D. R. Zenz et T. Kuchenrither (éds), *Municipal sewage sludge management: processing, utilization and disposal*. Lancaster, Pennsylvanie, U.S.A., Technomic Publishing, p. 537-657.
- Broadwell, A. H. (1994). Molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 5:27-29
- Burges, H. D. et N. W. Hussey (1971). *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, New York. 861 p.
- Burges, H. D., E. M. Thomson et R. A. Latchford (1976). Importance of spores and delta endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27:87-94.
- Burges, H. D. (1982) Control of insects by bacteria. *Parasitology*. 84:79-117.
- Burges, H. D. (1986). Production and use of pathogens to control insects pests. *Journal of Applied Bacteriology. Symposium supplement*, p. 127S-137S
- Burges, H. D. et R. A. Daoust (1986). Current status of the use of bacteria as biocontrol agents. Dans: R. A. Samson, J. M. Vlak et D. Peter (éds), *Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology*. Soc. Invert. Pathol. Wageningen

- Burton Environmental Engineering, RCG/Hagler, Bailly, Metcalf and Eddy (1993). *Water and wastewater industries: characteristics and DSM opportunities*. Electric power Research Institute, Palo Alto, Californie, U. S. A.
- Capalbo, D. (1995). *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment. A short review. *Mem Institute Oswaldo Cruz*, 90(1):135-138.
- Carlton, B. C. (1990). Economic considerations in marketing and application of biocontrol agents. Dans: *UCLA Symposium on molecular and cellular biology, new direction in biological control*. Los Angeles, Ca, p. 4419-4434.
- Carlton, B. C. et J. M. Gonzalez Jr. (1984). Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 11:246-252.
- Carlton, B. C. et J. M. Gonzalez Jr. (1985). The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. Dans: D. H. Dubnau (éd), *Molecular biology of the bacilli*. Academic Press, Inc., New York, p. 211-249.
- Chilcott, C. N. et J. S. Pillai (1985). The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1:327-332.
- Chul Kang, Byung, S. Y. Lee et H. N. Chang (1992). Enhanced spores production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 14(8):721-726.
- Cooksey, K. E. (1971). The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action. Dans: H. D. Burges et N. W. Hussey (éds), *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, Inc, New York, pp. 247-274.
- Couillard, D., M. Crowley et J. L. Sasseville (1986). Technological public choice in practice: the case of wastewater treatment facilities. *Journal of Environmental Management*, 22:133-146.
- Couillard, D. et G. Mercier (1994). An economic evaluation of biological removal of heavy metals from wastewater sludge. *Water Environment Research*, 66(1):32-39.
- Couillard, D. et Y. Grenier (1987). Alternative à la gestion des boues résiduaires municipales: recyclage en sylviculture. *Sciences et Techniques de l'Eau*, 3:(20) 215-220
- Couillard, D. et Y. Grenier (1989). Forest management: trees response to wastewater sludge fertilization. *Journal of Environmental Management*, 28:235-243.
- Couillard, D (1983). Quality of life: the importance of man-environment relations and a tentative conceptual model. *Journal of Environmental Systems*, 12(2):163-185.

- Crowley, M., J. L. Sasseville et D. Couillard (1986). L'importance accordée à l'évaluation technologique dans l'assainissement des eaux usées municipales au Québec. *Revue Internationale des Sciences de l'Eau*, 2(2):49-57.
- Daoust, R. (1990). Commercialization of bacterial insecticides. Dans: *VII International colloquium on invertebrate pathology and microbial control*. Australia, p.7-11.
- Davis, R. D. (1987). The use of sewage sludge on land in the United Kingdom. *Water Science and Technology*, 19(8):1-8
- de Barjac, H. (1982). Operational bacterial insecticides and their potential for future improvement. Dans: K. Maramorosch (éd.), *Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture*. San Diego, U.S.A. , Academic Press, p. 63-72.
- de Barjac, H., and Frachon, E. (1990) Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, 35: 233-240.
- Dharmsthiti, S. C., S. Pantuwatana et A. Bhumiratana (1985). 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*, 46:231-238.
- Dubois, N. R. (1968). Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Applied Microbiology*, 16:1098-1099.
- Dulmage, H. T. (1970a). Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var *alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:232-239.
- Dulmage, H. T. (1970b). Production of the spore δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 16:385-389.
- Dulmage, H. T., O. P. Boening, C. S. Rehnberg et G. D. Hansen (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18:240-245.
- Dulmage, H. T. et R. A. Rhodes (1971). Production of pathogens in artificial media. Dans: H. D. Burges et N. W. Hussey (éds), *Microbial Control of Insects and Mites*. New York, Academic Press, p. 507-540
- Dulmage, H. T. (1981) Production of microbial insecticides by fermentation. Dans: H. D. Burges (éd), *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic Press, p. 143-222.

- Dulmage, H. T., J. A. Correa et G. Gallegos-Morales (1981). Production of bacteria for biological control of insects. Dans: G. C. Papavizas (éd), *Biological control of crop production*. Totowa, N. J. Allanheld, Osmun and Co. p. 129.
- Dulmage, H. T., J. A. Correa et G. Gallegos-Morales (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* through standardization and fermentation development. Dans: de Barjac, H. et D. Sutherland (éds), *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. New Brunswick, NJ, Rutgers University Press, p. 110-133.
- Egorov, N. S., Zh. K. Loriya et T. G. Yudina (1984). Influence of amino acids on the synthesis of exoprotease by *Bacillus thuringiensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 19:487-491.
- Ejiofor, A. O. et N. Okafor (1989). Production of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on raw material media from Nigeria. *Journal of Applied Bacteriology*, 67:5-9.
- Ejiofor, A. O. et N. Okafor (1991). Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spores and crystals as mosquito larvicide. *Journal of Applied Bacteriology*, 71:202-206.
- Ejiofor, A. O. (1991). Production of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 as bioinsecticide using a mixture of 'spent' brewer's yeast and waste cassava starch as the fermentation medium. *Discovery and Innovation*, 3(2):85-88.
- Environnement Canada. (1985). L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Service de la protection de l'environnement. Guide SPE 6-EP-84-1.
- Fast, P. G. (1977). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: on the relative roles of spores and crystals in the toxicity to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Entomologist*, 110:1515-1518.
- Fast, P. G. (1981). The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. Dans: H. D. Burges et N. W. Hussey (éds) *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press Inc., p. 223-248.
- Faust, R. M., K. Abe, G. A. Held, T. Iizuka, L. A. Bulla Jr. et C. L. Meyers (1983). Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, 9:98-103.

- Federici, B. A., P. Luthy et J. E. Ibarra (1990). The parasporal body of BTI: structure, protein composition, and toxicity. Dans: H. de Barjac et D. Sutherland (éds), *Bacterial control of mosquitoes and blackflies; biochemistry, genetics and applications of Bacillus thuringiensis and Bacillus sphaericus*. New Brunswick, Rutgers University Press, p. 16-44.
- Federici, B. A. (1993). Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 22:357-371.
- Fernandez, W. L., T. A. Ocampo et D. C. Perez (1975). Coconut waters in three media reduced cell yield of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *Philippine Agriculturist*, 58:273-279.
- Fisher, W. S. (1993). Pesticides for tomorrow. *American Nurseryman*, p.77-80
- Foda, M. S., H. S. Salama et M. Selim (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22:50-52.
- Foda, M. S. et H. S. Salama (1986). New fermentations technologies for the production of bacterial insecticides. *Zentralblatt fuer Mikrobiologie*, 141:151-157.
- Freese, E. et Y. Fujita (1976). Control of enzyme synthesis during growth and sporulation. Dans: D. Schlesinger (éd), *Microbiology-1976*. Washington, D. C., American Society for Microbiology, p. 164-168.
- Gelernter, W. (1990). *Bacillus thuringiensis*, bioengineering and the future of bioinsecticides. Dans: *Brighton crop protection conference*. 7A3:617-624.
- Georghiou, G. P. et A. Lagunes (1988). The occurrence of resistance to pesticides: cases of resistance reported worldwide through 1988. *F.A.O. Rome*, p. 35.
- Gill, S. S., E. A. Cowles et P. V. Pietrantonio (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37:615-636.
- Giroux, I. (1986). Évaluation des sites pour l'épandage de boues d'usine d'épuration. INRS-EAU, Université du Québec, mémoire de maîtrise, 175 p.
- Goldberg, I., B. Sneh, E. Battat et D. Klein (1980). Optimization of a medium for a high yield preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. *Biotechnology Letters*, 2(10):419-426.
- Goldberg, L. J. et J. Margalit (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, 37:355-358.

- Gonzalez, J. M. Jr., H. T. Dulmage et B. C. Carlton (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, 5: 351-365.
- Gonzalez, J. M. Jr., B. J. Brown et B. C. Carlton (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:6951-6955.
- Gonzalez, J. M. Jr. et B. C. Carlton (1984). A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid*, 11:28-38.
- Gouvernement du Québec (1983). Rapport du groupe de travail sur le programme d'assainissement des eaux du Québec. Ministère de l'Environnement. Québec, Canada.
- Gouvernement du Québec (1991). Valorisation agricole des boues de stations d'épuration des eaux usées municipales - Guide de bonnes pratiques. Québec, Canada, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, juillet, 91 p.
- Grenier, Y. et D. Couillard (1989). Avantages et faisabilité de l'épandage forestier des boues résiduaires. *Forêts Chroniques*, 65:9-15.
- Hannay, C. L. (1953). Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria, *Nature*, 172:1004.
- Harper, S. R., C. C. Ross et G. E. Valentine (1988) Agricultural wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, 60:876-884
- Heimpel, A. M. et T. A. Angus (1959). The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *Journal of Insect Pathology*, 1:152-170.
- Höfte, H. et H. R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, 53(2):242-255.
- Holmberg, A., R. Sievanen et G. Carlberg (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: process analysis study. *Biotechnology and Bioengineering*, 22:1707-1724.
- Kanda, K. (1987). Expression of δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Dans: Maramorosch, K. (Éd), *Expression of δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis*. San Diego, Ca. U.S.A. Academic Press, p. 75-84

- Kang, B., S. Y. Lee et H. N. Chang (1992). Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 14:(8),721-726.
- Keil, C. B. (1991). Field and laboratory evaluation of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of fly pests of mushrooms. *Journal of Economic Entomology*, 84(4):1180-1188.
- Komano, T., K., K. S. Yoshida et H. Sakai (1992). Expression of insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* in bacteria. Dans: Malik, V. Et P. Sridhar. (éds), *Industrial Biotechnology*. India, Oxford & IBH publishing Co. PVT. LTD., p. 231-236.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch et W. Schnetter (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Journal of Applied Entomology*, 96:500-505.
- Kuppusamy, M. et K. Balaraman (1991). Fed-batch fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesising delta endotoxin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29:1031-1034.
- Lambert, B. et Peferoen, M. (1992). Insecticidal process of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*. 42(2):112-122.
- Lavrikova, V. V., V. A. Irikov, T. G. Yudina, T. K. Krashennnikova et V. M. Kantere (1992). Optimization of aeration conditions during culturing of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain z-52 with the use of an integral quasi-dynamic model. *Bioteknologiya*, 2:61-66.
- Lee, H.L. et P. Seleena (1991). Fermentation of a malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22(1):108-112.
- Lereclus, D., A. Delécluse et M. M. Lecadet (1993). Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. Dans: Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey et S. Higgs. (Éds), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide theory and practice*. England, John Wiley and Sons. p. 37-69.
- Lester, J. N., R. M. Sterritt et P. W. W. Kirk (1983). Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes II. Sludge treatment and disposal. *The Science of the total environment*, 30:45-83.
- Lisansky, S. G., R. Quinlan et G. Tassoni (1993). The *Bacillus thuringiensis* production handbook. CPL Press, Royaume Uni, p. 1-124

- McKenny, C. (1990). Bt keeps bugs from bouncing back. *The Grower*, 8:22-24.
- MENVIQ et MAPAQ (1991). Valorisation agricoles des boues de stations d'épuration des eaux municipales: guide des bonnes pratiques. Québec, 91 p.
- Mercier, G. (1988). L'extraction biologique des métaux lourds des boues anaérobies d'épuration. INRS-EAU, Mémoire de maîtrise No. 207, 212 p.
- Metcalf and Eddy (1972). *Wastewater engineering. Treatment, disposal and reuse*. San Francisco, McGraw-Hill, p. 1334.
- Mettus, A. M. and Macaluso, A. (1990) Expression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin genes during vegetative growth. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1128-1134.
- Meyer, H. P., O. Käppeli et A. Fiechter (1985) Growth control in microbial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 39:299-319.
- Moraes I. O., M. H. A. Santana et C. O. Hokka (1980). The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. *Advances in Biotechnology, Proceedings of the 6th International fermentation symposium*. London, Canada, Vol. 1, pp. 75-79.
- Mostaghimi, S., T. M. Younos et U. S. Tim (1992). Effects of sludge and chemical fertilizer application on runoff water quality. *Water Resources Bulletin*, American Water Resources Association, 28(3):545-552.
- Mummigatti, S. G. et N. Raghunathan (1988). Production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by three different methods and its relative toxicity to *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55:115-118.
- Mummigatti, S. G. et N. Raghunathan (1990). Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55:147-151.
- Navon, A. (1993). Control of Lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. Dans: Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey et S. Higgs (éds), *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and practice*. Great Britain, John Wiley & sons, p. 125-146.
- Obeta, J. A. N. et N. Okafor (1984). Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(4): 863-867.
- Olivier (1994). Des boues sans nuisance. *Point, Sciences et Techniques*, 5(1):4-8.

- Pahren, H. R. (1980). Overview of the problem. Dans: Bitton, G, B. L. Damron, G. T. Edds et J. M. Davidson (éds), *Sludge health risks of land application*. Ann Arbor, USA, Ann Arbor Science Publishers, p. 1-5.
- Parenti, P., M. Villa, M. Tasca, P. Belgiojoso, G. M. Hanozet et B. Giordana (1993). A rapid and sensitive *in vitro* assay for the activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Compilations of Biochemical Physiology*, 104B(2):375-379.
- Pearson, D. et O. P. Ward (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. *Biotechnology Letters*, 10:(7)451-456.
- Préfontaine, G., P. Fast, P C. K. Lau, M. A. Hefford, A. Hanna et R. Brousseau (1987). Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2808-2814.
- Qasim, R. S. (1982). *Wastewater treatment plants. Planning, design and operations*. New York, Holt, Rinehart and Winston, 726 p.
- Rajalakshmi, S. et Y. I. Shethna (1977). The effect of aminoacids on growth, sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Journal of the Indian Institute of Science*, 59:169-176.
- Rajinchapel-Messaï, J. (1993). *Bacillus thuringiensis*, les insectes font de la résistance. *Biofutur*, 10:33.38.
- Roques, H. (1979). *Fondements théoriques du traitement biologique des eaux VI et V2*. Paris techniques et documentation, 1813 p.
- Rogoff, M. H., C. M. Ignoffo, G. Singer, I. Gard, et A. P. Prieto (1969). Insecticidal activity of thirty-one strains of *Bacillus thuringiensis* against five insect species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14:122-129.
- Rowe, G. E. et A. Margaritis (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 6(1): 87-127.
- Rowe, G. E. (1990). Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London, Ontario, Canada. Ph. Doc. thesis 295 p.
- Sabey, B. R. et W. E. Hart (1975). Land application of sewage sludge: effect on growth and chemical composition of plants. *Journal of Environmental Quality*, 4:252-256.

- Salama, H. S., M. S. Foda, A. El-Sharaby et M. H. Selim (1983a). A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. *Entomophaga*, 28(2):151-160.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H. T. Dulmage et A. El-Sharaby (1983b). Novel fermentation media for production of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41:8-19.
- Salama, H. S., M. S. Foda, M. H. Selim et A. El-Sharaby (1983c). Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Zentralblatt fuer Mikrobiologie*, 138:553-563.
- Salama, H. S. et O. N. Morris (1993). The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. Dans: P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, M. J. et S. Higgs (éds) *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and practice*. John Wiley & sons, Great Britain, pp. 237-253.
- Sakharova, Z. V., Y. N. Ignatenko, M. P. Khourychev, V. P. Likov, I. L. Rabotnova et V. V. Shevtson (1984). Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* with growth limitation via the nutrient sources. *Microbiology*, 53(2):221.
- Sakharova, Z. V., Y. N. Ignatenko, F. Shchul'ts, M. P. Khovrychev et I. L. Rabotnova (1985). Kinetics of the growth and development of *Bacillus thuringiensis* during batch culturing. *Mikrobiologiya (Engl. Transl.)*, 54:483-488.
- Sakharova, Z. V., I. L. Rabotnova et M. P. Khovrychev (1989). Growth and spores formation in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. *Mikrobiologiya (Engl. Transl.)*, 54:483-488.
- Selinger, L. B. Dawson, P. S. S., and Khachatourians, G. G. (1988). Behavior of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* under continuous phased cultivation in a cyclone fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 247-253.
- Scherrer, P., P. Lüthy et B. Trumpi (1973). Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Applied Microbiology* 25(4):644-646.
- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar et S. K. Majumdar (1991). Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnology Letters*, 13(7):511-514.
- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar et S. K. Majumdar (1993). Optimization of process for production of delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in a 5-litre fermentor. *Biochemical archives*. 9:119-123.

- Singer, S., N. S. Goodman et M. H. Rogoff (1966). Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 139:16-23.
- Singer, S., et M. H. Rogoff (1968). Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by amino acids in defined media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12:98-104.
- Smirnoff, W. A. (1963) The formulation of crystals in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner before sporulation at a low-temperature incubation. *Journal of Insect Pathology*, 5:242-250.
- Stahly, D. P., R. E. Andrews et A. A. Yousten (1992). The Genus *Bacillus*-Insect Pathogens. Dans: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds), *The Prokaryotes*. London, Springer-Verlag, p. 1697-1745.
- Su, Y. C. et W. I. Hwang (1992). Production and application of spores-crystal complex from *Bacillus thuringiensis* culture. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 30(4):569-581.
- Taborsky, V. Small-scale processing of microbial pesticides (1992). Dans: *Agricultural Services Bulletin*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, p. 1-90.
- Tyagy, R. D. et D. Couillard (1989). Bacterial leaching of metals from sludge. Dans: P. E. Cheremisinoff (éd), *Encyclopedia of Environmental Control Technology, volume 3: Wastewater Treatment Technology*. Houston, U. S. A., Gulf Publishing, p. 557-591.
- Tyagi, R. D., J. F. Blais, N. Meunier et D. Kluepfel (1993). Biolixiviation des métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration: essais en bioréacteur opéré en mode cuvée. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 20:57-64.
- U. S. Environmental Protection Agency (1979). *Sludge treatment and disposal. Process design manual*. U. S. A., EPA-625/1-79-011.
- U. S. Environmental Protection Agency (1990). *National sewage sludge survey: availability of information and data and anticipated impacts on proposed regulations, proposed rule*. U. S. Fed. Register 55:47209-47283.
- U. S. Environmental Protection Agency (1993). *Standards for the use and disposal of sewage sludge, 40 CFR Parts 257, 403 and 503, Final Rule*. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.
- Valéro, J. R. (1990). Microbiologie contre tordeuse: recherches à Forêts Canada-Région du Québec. *L'Aubelle*, 12:12-15

- Venugopal, M. G., M. G. Wolfersberger et B. A. Wallace. 1992. Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Biotechnical et Biophysical Acta*, 1159:185-192.
- Vergès, G. (1984). La disposition des boues des stations d'épuration. *Colloque sur l'assainissement des eaux*. U. M. Q., p. 11.
- Vesilind, P. A. (1980). Treatment and disposal of wastewater sludges. Ann Arbor Science Publishers. Ann Arbor, USA.
- Webber, M. D. (1984). Épandage des boues résiduelles sur les sols: une évaluation. Agriculture Canada. Direction Générale de la Recherche, Agriculture Canada, 45 p.
- Webber, M. D. (1986). Épandage des boues d'épuration sur les terres agricoles - une évaluation. Direction Générale de la Recherche, Agriculture Canada, 42 p.
- Webber, M. D. (1988). Contrôle de la concentration de métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. *Sciences and Techniques de l'Eau*, 21(1):45-51.
- WHO (1985). *Tropical disease research (TDR)*, Seventh programme report on biological control of vectors. Geneva, World Health Organization, 10/1-10/16.
- Wong, L. Et J. G. Henry (1984). Decontaminating biological sludge for agricultural use. *Water Science and Technology*, 17(4/5):575-586.
- Yudina, T. G., O. V. Salamakha, E. V. Olekhovich, N. P. Rogatykh et N. S. Egorov (1993). Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 61(4):402-407.

ANNEXE A

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique CL ₅₀ mg/mL	Auteurs
Endosperme de noix de coco	de Barjac	Bouillir et filtrer	<i>israelensis</i>	Larves de <i>Aedes australis</i>	0.76	Chilcott et Pillai, 1985
Sous-produit de la production de glutamate de monosodium	Bouillon Difco additionné de sels minéraux et du glucose		<i>israelensis</i>	Larves de <i>Aedes aegypti</i>	10 ^{-7.2}	Dharmsthiti <i>et al.</i> , 1985
Fécule de cassave et levure usée de brasserie		Lavage et centrifugation de la levure fermentation de la cassave pendant 7 jours	<i>israelensis</i>	Larves de <i>Aedes aegypti</i>	12	Ejiofor, 1991 ^a
Fecule de cassave	Bouillon de culture (Oxoid) avec levure et sels minéraux	Fermentation, filtration et concentration	<i>israelensis</i>	Larves de <i>Aedes aegypti</i>	n.d. ^b	Ejiofor et Okafor, 1989
Liquor de maïs fermentée					25	
Liquor de pois					29	

^a Expériences réalisées dans des fermenteurs de 1 L et de 5L; ^b n.d. = non déterminé

ANNEXE A (suite)

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique DL ₅₀ µg/g du corps de <i>B. mori</i>	Auteurs
Levure et phosphates de potassium avec:	U. S. Standard HD-19-1980		<i>thuringiensis</i>	Larves de <i>Bombyx mori</i>		Mummigatti et Raghunathan, 1990
1% fécule+1% pois					133.9	
1% pois+1% mélasses					52.1	
1%pois+0.5 fécule+0.5 mélasses					195.7	
1% farine de soja+1% fécule					55.7	
1% farine de soja+1% mélasses					57	

ANNEXE A (suite)

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique CL ₅₀ µg/ml	Auteurs
Sang de vache et sels minéraux additionné avec:	Poudre standard de <i>B.t. israelensis</i>	Bouillir et filtrer les poudres. Stérilisation du sang et séchage pendant 20 heures	<i>israelensis</i>	Larves de <i>Aedes aegypti</i>		Obeta et okafor, 1984
des arachides					0.1-0.22	
des pois					0.02	
farine de soja					0.027	
des pois noirs					0.011	
farine de pois de bambarra					0.011	

ANNEXE A (suite)

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique, % de mortalité après 7 jours	Auteurs
Petit lait	Contenant de la peptone, de la levure, du glucose et du phosphate de potassium		<i>kurstaki</i> HD-1	Larves de <i>Spodoptera exigua</i>	100	Salama <i>et al.</i> , 1983
dilué					40	
dilué+2% de levure de fourrage					40	
dilué+2% de fève de lima					60	
dilué +2% des haricots de soissons					90	

ANNEXE A (suite)

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique, % de mortalité après 7 jours	Auteurs
2% de fève de lima dans MS	Solution minérale (MS)		<i>entomocidus</i>	Larves de <i>Spodoptera littoralis</i>	56	Salama <i>et al.</i> , 1983
2% de fève de lima dans l'eau					52	
1% de fève de lima+1% levure de fourrage+MS					82	
1% de fève de lima+1% de fourrage +eau					76	
2% levure de fourrage+1% dextrine dans MS					72	
2% levure de fourrage+1% dextrine+eau					78	

ANNEXE A (suite)

Production et efficacité biologique de *Bacillus thuringiensis* produit à partir de divers milieux alternatifs de culture

Milieu alternatif	Milieu de référence	Prétraitement du milieu alternatif	Variété de <i>B. thuringiensis</i>	Insecte cible	Efficacité biologique, % de mortalité après 7 jours	Auteurs
2 % de farine de poisson+eau	Solution minérale (MS)		<i>entomocidus</i>	Larves de <i>Spodoptera littoralis</i>	8	Salama <i>et al.</i> , 1983
2% farine de coton+eau					68	
2% levure de fourrage+eau					84	
Milieu de référence avec:	Contenant du glucose, levure de fourrage et sels minéraux		<i>entomocidus</i>	Larves de <i>Heliothis armigera</i>	20	Salama <i>et al.</i> , 1983
extrait de carottes					n.d.	
extrait de pommes de terre					n.d.	
farine de dattes					25	
écorce de citron					0	

ANNEXE B

Procédure pour l'élevage des larves de tordeuse de bourgeons d'épinette (TBE)

1. Placer un morceau de nylon contenant la quantité approximative des larves requise pour les bioessais dans un contenant en verre préalablement désinfecté et deux morceaux de diète solide pour maintenir l'humidité.
2. Couvrir le contenant avec une pellicule adhérent de façon à empêcher la sortie de larves émergées et le placer près de la lumière pour faciliter la sortie de diapause.
3. Le lendemain, à l'aide d'un pinceau désinfecté, transférer les larves émergées dans des récipients en plastique contenant la diète solide, à raison de 25 larves par récipient. Laisser les récipients à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
4. Après une semaine, les larves atteignant le stade L3-L4 sont prêtes pour l'utilisation pour les bioessais.

ANNEXE C

Composition de la diète solide artificielle

Composant	Quantité
Eau distillée	500 mL
Caséine (sans vitamine)	28 g
Hydroxyde de potassium 4M	4 g
Alphacel	4 g
Mélange de sel Wesson (salt mixture Wesson)	8 g
Germe de blé	24 g
Chlorure de choline	0.8 mL
Solution de vitamines	8 ml
Acide ascorbique	3.2 g
Formaldéhyde 40%	0.4 mL
Sucrose	28 g
Agar	20 g
<hr/>	
Solution de vitamines	
Eau distillée	100 mL
Niacine	100 mL
Pantothénate de calcium	100 mL
Riboflavine	50 mg
Hydrochloride de thiamine	25 mg
Hydrochloride de pyridoxine	25 mg
Acide folique	25 mg
Biotine	2 mg
Vitamine B 12	0.2 mg

ANNEXE D

Composition de la diète liquide artificielle sans agar

Composant	Quantité
Eau distillée	1000 mL
Caséine (sans vitamine)	35 g
Hydroxyde de potassium 4M	5 g
Alphacel	5 g
Mélange de sel Wesson (salt mixture Wesson)	10 g
Chlorure de choline	44 g
Solution de vitamines	0.8 mL
Acide ascorbique	4 g
Formaldéhyde 40%	2 mL
Méthyl-p-hydroxybenzoate	1.5 g
Sucrose	35 g
Bouillon nutritif	10.3 g
<hr/>	
Solution de vitamines	
Eau distillée	100 mL
Niacine	100 mL
Pantothénate de calcium	100 mL
Riboflavine	50 mg
Hydrochloride de thiamine	25 mg
Hydrochloride de pyridoxine	25 mg
Acide folique	25 mg
Biotine	2 mg
Vitamine B 12	0.2 mg

ANNEXE E

Composition du milieu farine de soja

Composant	g/L
Farine de soja	15
Dextrose	5
Amidon	5
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.02
CaCO ₃	1.0

ANNEXE F

Préparation du Mastermix

Composant	Volume en µl
H ₂ O distillé	417
Tampon 10X	60
MgCl (25 mM)	36
dNTPs (20mM)	12
Taq polymérase	3
Volume final	538

ANNEXE G

Calculs pour la détermination du taux maximum spécifique de croissance μ , dans les boues d'épuration. Conditions d'opération: 30°C et 250 rpm

Boue: Black Lake secondaire (BLS)

pH initial= 6.5; pH final= 8.0

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.10E+03	1.00E+00	2.10E+03	0.06
1	4.50E+03	1.00E+00	4.50E+03	0.09
1.5	2.00E+04	1.00E+00	2.00E+04	0.12
2	8.00E+04	1.00E+00	8.00E+04	0.07
2.5	1.00E+05	1.00E+00	1.00E+05	0.02
3	1.30E+05	1.00E+00		

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 7.5

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.30E+04	1.00E+00	2.30E+04	0.29
1	9.70E+05	1.00E+00	9.70E+05	0.21
1.5	4.00E+06	5.00E+02	4.00E+06	0.11
2	1.50E+07	6.70E+04	1.49E+07	0.07
2.5	2.30E+07	5.00E+05	2.25E+07	0.03
3	3.40E+07	1.00E+06	3.30E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 7.5

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.50E+04	1.00E+00	1.50E+04	0.22
1	1.80E+05	1.00E+00	1.80E+05	0.14
1.5	4.00E+05	1.00E+00	4.00E+05	0.07
2	9.50E+05	1.00E+00	9.50E+05	0.06
2.5	1.60E+06	2.00E+02	1.60E+06	0.04
3	2.30E+06	2.10E+04	2.28E+06	

ANNEXE G (suite)

Boue: Black Lake digérée aérobie (BLDA) pH initial= 6.0; pH final 7.5

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ, 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	1.00E+03	
0.5	2.00E+03	1.00E+03	2.00E+03	0.06
1	4.50E+03	1.00E+00	4.50E+03	0.19
1.5	2.00E+05	1.00E+00	2.00E+05	0.32
2	1.00E+07	1.00E+00	1.00E+07	0.18
2.5	1.60E+07	1.10E+02	1.60E+07	0.03
3	2.30E+07	1.00E+00	2.30E+07	

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 7.5

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ, 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.00E+04	1.00E+00	2.00E+04	0.24
1	3.00E+05	1.00E+00	3.00E+05	0.20
1.5	2.50E+06	1.00E+00	2.50E+06	0.18
2	2.30E+07	1.00E+00	2.30E+07	0.10
2.5	3.00E+07	1.00E+00	3.00E+07	0.03
3	4.20E+07	1.00E+00	4.20E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ, 1/h
0				
0.5				
1	3.60E+03	1.00E+00	3.60E+03	
1.5	1.50E+04	1.00E+02	1.49E+04	0.12
2	5.90E+04	8.00E+03	5.10E+04	0.08
2.5	1.00E+05	5.00E+04	5.00E+04	

ANNEXE G (suite)

Boue: Sainte Claire (SCS)

pH initial= 7.0; pH final 8.5

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	4.00E+04	1.00E+00	4.00E+04	0.29
1	1.10E+06	1.00E+00	1.10E+06	0.17
1.5	2.50E+06	1.00E+00	2.50E+06	0.06
2	5.00E+06	1.00E+00	5.00E+06	0.04
2.5	6.50E+06	1.00E+00	6.50E+06	0.02
3	8.00E+06	1.00E+00	8.00E+06	

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	4.00E+04	1.00E+00	4.00E+04	0.30
1	1.50E+06	1.00E+00	1.50E+06	0.19
1.5	3.80E+06	1.00E+00	3.80E+06	0.07
2	8.40E+06	1.00E+00	8.40E+06	0.04
2.5	1.10E+07	1.00E+00	1.10E+07	0.03
3	1.70E+07	1.00E+00	1.70E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.1

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.10E+04	1.00E+00	1.10E+04	0.20
1	1.20E+05	1.00E+00	1.20E+05	0.14
1.5	3.00E+05	1.00E+00	3.00E+05	0.07
2	6.30E+05	1.00E+00	6.30E+05	0.05
2.5	1.00E+06	6.00E+02	9.99E+05	0.04
3	1.75E+06	1.00E+05	1.65E+06	0.03
3.5	2.20E+06	6.00E+05	1.60E+06	

ANNEXE G (suite)

Boue: Beauceville (BVS)

pH initial= 6.5; pH final 8.5

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.50E+04	1.00E+00	1.50E+04	0.21
1	1.60E+05	1.00E+00	1.60E+05	0.13
1.5	3.50E+05	1.00E+00	3.50E+05	0.06
2	7.50E+05	1.00E+00	7.50E+05	0.09
2.5	2.70E+06	1.00E+00	2.70E+06	0.10
3	8.30E+06	1.00E+00	8.30E+06	0.08
3.5	1.90E+07	1.00E+00	1.90E+07	

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.50E+04	1.00E+00	1.50E+04	0.22
1	1.80E+05	1.00E+00	1.80E+05	0.14
1.5	4.00E+05	1.00E+00	4.00E+05	0.06
2	8.50E+05	1.00E+00	8.50E+05	0.08
2.5	3.00E+06	1.00E+00	3.00E+06	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.1

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	3.10E+03	1.00E+00	3.10E+03	0.09
1	9.00E+03	1.00E+00	9.00E+03	0.11
1.5	4.00E+04	1.00E+00	4.00E+04	0.12
2	1.70E+05	1.00E+00	1.70E+05	0.11
2.5	6.00E+05	4.00E+02	6.00E+05	0.10
3	1.90E+06	8.00E+04	1.82E+06	

ANNEXE I (suite)

Boue de Jonquière avec solution PBS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	2.61E+07	1.00E+00	2.61E+07	
3	2.70E+07	1.00E+00	2.70E+07	0.02
6	2.90E+07	1.00E+00	2.90E+07	0.02
9	3.00E+07	1.00E+00	3.00E+07	0.04
12	3.60E+07	1.00E+00	3.60E+07	0.08
15	4.90E+07	1.00E+00	4.90E+07	0.07
18	5.50E+07	1.00E+00	5.50E+07	0.05
21	6.50E+07	1.80E+07	4.70E+07	0.04
24	6.90E+07	2.20E+07	4.70E+07	0.02
27	7.30E+07	3.00E+07	4.30E+07	0.02
30	7.70E+07	3.50E+07	4.20E+07	0.02
33	8.20E+07	4.20E+07	4.00E+07	0.02
36	8.50E+07	5.15E+07	3.35E+07	0.02
39	9.00E+07	5.70E+07	3.30E+07	0.02
42	9.70E+07	6.00E+07	3.70E+07	0.02
45	1.00E+08	6.55E+07	3.45E+07	0.02
48	1.11E+08	9.15E+07	1.95E+07	0.02
51	1.10E+08	9.70E+07	1.30E+07	0.01
54	1.15E+08	1.00E+08	1.50E+07	0.01
57	1.20E+08	1.13E+08	7.00E+06	0.01
60	1.23E+08	1.15E+08	8.00E+06	0.01
63	1.27E+08	1.20E+08	7.00E+06	0.01
66	1.32E+08	1.18E+08	1.40E+07	0.01
69	1.33E+08	1.15E+08	1.80E+07	0.00
72	1.34E+08	1.21E+08	1.30E+07	

ANNEXE I (suite)

Boue de Jonquière avec solution TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	2.20E+07	1.00E+00	2.20E+07	
3	2.50E+07	1.00E+00	2.50E+07	0.03
6	2.70E+07	1.00E+00	2.70E+07	0.03
9	2.95E+07	1.00E+00	2.95E+07	0.04
12	3.40E+07	1.00E+00	3.40E+07	0.08
15	4.90E+07	1.00E+00	4.90E+07	0.07
18	5.20E+07	1.00E+00	5.20E+07	0.06
21	6.90E+07	1.00E+00	6.90E+07	0.06
24	7.55E+07	1.35E+07	6.20E+07	0.05
27	9.05E+07	2.00E+07	7.05E+07	0.03
30	9.20E+07	2.40E+07	6.80E+07	0.01
33	9.70E+07	3.40E+07	6.30E+07	0.01
36	1.00E+08	4.00E+07	6.00E+07	0.01
39	1.05E+08	4.80E+07	5.70E+07	0.01
42	1.08E+08	5.40E+07	5.40E+07	0.01
45	1.11E+08	6.30E+07	4.80E+07	0.01
48	1.15E+08	7.40E+07	4.10E+07	0.01
51	1.20E+08	1.00E+08	2.00E+07	0.01
54	1.25E+08	1.11E+08	1.40E+07	0.01
57	1.31E+08	1.21E+08	1.00E+07	0.01
60	1.36E+08	1.30E+08	6.00E+06	0.01
63	1.38E+08	1.33E+08	5.00E+06	0.00
66	1.39E+08	1.32E+08	7.00E+06	0.00
69	1.40E+08	1.33E+08	7.00E+06	0.00
72	1.42E+08	1.34E+08	8.00E+06	

ANNEXE J

Calculs pour la détermination du taux maximum spécifique de croissance μ (1/h) de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière en faisant un choc thermique au cours de la fermentation.

Boue de Jonquière sans tampon

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	2.82E+07	1.00E+00	2.81E+07	
3	2.90E+07	1.00E+00	2.90E+07	0.01
6	3.00E+07	1.00E+00	3.00E+07	0.02
9	3.20E+07	1.00E+00	3.20E+07	0.03
12	3.70E+07	1.00E+00	3.70E+07	0.05
15	4.30E+07	9.80E+06	3.32E+07	0.08
18	5.90E+07	1.34E+07	4.56E+07	0.07
21	6.50E+07	2.00E+07	4.50E+07	0.05
24	7.80E+07	3.30E+07	4.50E+07	0.04
27	8.40E+07	4.67E+07	3.73E+07	0.04
30	9.70E+07	6.10E+07	3.60E+07	0.04
33	1.10E+08	7.20E+07	3.80E+07	0.04
36	1.25E+08	8.15E+07	4.35E+07	0.03
39	1.28E+08	9.20E+07	3.60E+07	0.01
42	1.31E+08	1.00E+08	3.10E+07	0.01
45	1.35E+08	1.04E+08	3.10E+07	0.01
48	1.38E+08	1.10E+08	2.80E+07	0.01
51	1.40E+08	1.19E+08	2.10E+07	0.00
54	1.42E+08	1.23E+08	1.95E+07	0.01
57	1.45E+08	1.22E+08	2.30E+07	0.00
60	1.45E+08	1.27E+08	1.85E+07	0.00
63	1.48E+08	1.24E+08	2.40E+07	0.00
66	1.44E+08	1.25E+08	1.90E+07	0.00
69	1.48E+08	1.21E+08	2.70E+07	0.00
72	1.45E+08	1.23E+08	2.20E+07	

ANNEXE J (suite)

Boue avec solution TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	3.10E+07	1.00E+00	3.10E+07	
3	3.20E+07	1.00E+00	3.20E+07	0.02
6	3.50E+07	1.00E+00	3.50E+07	0.02
9	3.60E+07	1.00E+00	3.60E+07	0.03
12	4.20E+07	1.00E+00	4.20E+07	0.06
15	5.30E+07	1.00E+00	5.30E+07	0.08
18	6.70E+07	1.10E+02	6.70E+07	0.06
21	7.40E+07	2.01E+07	5.39E+07	0.03
24	7.80E+07	3.32E+07	4.49E+07	0.02
27	8.50E+07	4.01E+07	4.49E+07	0.02
30	8.90E+07	5.20E+07	3.70E+07	0.01
33	9.20E+07	6.60E+07	2.60E+07	0.01
36	9.60E+07	7.00E+07	2.60E+07	0.01
39	9.90E+07	7.77E+07	2.13E+07	0.01
42	1.00E+08	8.03E+07	1.97E+07	0.01
45	1.04E+08	8.40E+07	1.95E+07	0.02
48	1.10E+08	9.12E+07	1.88E+07	0.02
51	1.16E+08	9.60E+07	2.00E+07	0.01
54	1.19E+08	1.01E+08	1.80E+07	0.01
57	1.21E+08	1.10E+08	1.10E+07	0.01
60	1.23E+08	1.09E+08	1.40E+07	0.01
63	1.25E+08	1.12E+08	1.30E+07	0.00
66	1.22E+08	1.15E+08	7.00E+06	0.00
69	1.24E+08	1.12E+08	1.20E+07	0.00
72	1.23E+08	1.15E+08	8.00E+06	

ANNEXE K

Expériences réalisées en variant le régime d'agitation

1 ère expérience: à 350 rpm et 32 °C

Boue Jonquière

Heure	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
0	3.05E+07	1.00E+00	3.05E+07	
3	3.20E+07	1.00E+00	3.20E+07	0.05
6	4.10E+07	1.00E+00	4.10E+07	0.07
9	5.00E+07	1.00E+00	5.00E+07	0.07
12	6.10E+07	7.95E+06	5.31E+07	0.06
15	7.00E+07	1.50E+07	5.50E+07	0.03
18	7.50E+07	2.00E+07	5.50E+07	0.02
21	7.90E+07	2.80E+07	5.10E+07	0.02
24	8.70E+07	4.20E+07	4.50E+07	0.02
27	9.10E+07	5.60E+07	3.50E+07	0.02
30	1.01E+08	7.10E+07	3.00E+07	0.02
33	1.05E+08	7.90E+07	2.60E+07	0.01
36	1.07E+08	8.40E+07	2.30E+07	0.01
39	1.10E+08	8.80E+07	2.20E+07	0.01
42	1.15E+08	9.12E+07	2.38E+07	0.01
45	1.14E+08	9.34E+07	2.06E+07	0.00
48	1.13E+08	9.73E+07	1.57E+07	0.00
51	1.12E+08	9.91E+07	1.29E+07	0.00
54	1.14E+08	1.00E+08	1.40E+07	0.00
57	1.13E+08	1.02E+08	1.10E+07	0.00
60	1.12E+08	1.04E+08	8.00E+06	0.00
63	1.13E+08	1.00E+08	1.30E+07	0.00
66	1.14E+08	1.01E+08	1.30E+07	0.00
69	1.12E+08	1.00E+08	1.20E+07	0.00
72	1.12E+08	1.02E+08		

ANNEXE K (suite)

1 ère expérience: à 350 rpm et 32 °C

Boue + TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	4.25E+07	1.00E+00	4.25E+07	
3	4.40E+07	1.00E+00	4.40E+07	0.02
6	4.90E+07	1.00E+00	4.90E+07	0.04
9	5.70E+07	1.00E+00	5.70E+07	0.07
12	7.50E+07	1.00E+00	7.50E+07	0.06
15	8.40E+07	1.00E+07	7.40E+07	0.03
18	9.20E+07	1.86E+07	7.34E+07	0.03
21	9.80E+07	2.54E+07	7.26E+07	0.03
24	1.10E+08	3.90E+07	7.10E+07	0.03
27	1.18E+08	6.00E+07	5.80E+07	0.02
30	1.22E+08	7.80E+07	4.40E+07	0.02
33	1.32E+08	8.22E+07	4.98E+07	0.02
36	1.38E+08	9.35E+07	4.45E+07	0.01
39	1.40E+08	1.01E+08	3.90E+07	0.00
42	1.41E+08	1.18E+08	2.30E+07	0.00
45	1.39E+08	1.23E+08	1.60E+07	0.00
48	1.40E+08	1.27E+08	1.30E+07	0.00
51	1.38E+08	1.31E+08	7.00E+06	0.00
54	1.37E+08	1.35E+08	2.00E+06	0.00
57	1.40E+08	1.37E+08	3.00E+06	0.00
60	1.41E+08	1.39E+08	2.00E+06	0.00
63	1.38E+08	1.37E+08	1.00E+06	0.00
66	1.40E+08	1.39E+08	1.00E+06	0.00
69	1.38E+08	1.38E+08	0.00E+00	0.00
72	1.40E+08	1.38E+08	2.00E+06	

ANNEXE K (suite)

2 ième expérience: à 250 rpm et 32 °C

Boue Jonquière

Heure	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
0	2.70E+07	1.00E+00	2.70E+07	
3	2.90E+07	1.00E+00	2.90E+07	0.02
6	3.00E+07	1.00E+00	3.00E+07	0.03
9	3.40E+07	1.00E+00	3.40E+07	0.06
12	4.30E+07	1.00E+00	4.30E+07	0.08
15	5.50E+07	1.00E+00	5.50E+07	0.07
18	6.50E+07	5.25E+06	5.98E+07	0.05
21	7.40E+07	1.20E+07	6.20E+07	0.04
24	8.10E+07	1.90E+07	6.20E+07	0.03
27	8.60E+07	2.60E+07	6.00E+07	0.02
30	9.10E+07	4.00E+07	5.10E+07	0.02
33	9.70E+07	5.20E+07	4.50E+07	0.02
36	1.00E+08	6.00E+07	4.00E+07	0.02
39	1.12E+08	6.75E+07	4.45E+07	0.02
42	1.15E+08	7.85E+07	3.65E+07	0.02
45	1.25E+08	8.20E+07	4.30E+07	0.02
48	1.30E+08	9.00E+07	4.00E+07	0.01
51	1.36E+08	9.80E+07	3.80E+07	0.01
54	1.38E+08	1.02E+08	3.60E+07	0.01
57	1.41E+08	1.04E+08	3.70E+07	0.00
60	1.38E+08	1.06E+08	3.20E+07	0.00
63	1.41E+08	1.10E+08	3.10E+07	0.00
66	1.40E+08	1.12E+08	2.80E+07	0.00
60	1.42E+08	1.14E+08	2.80E+07	0.00
72	1.40E+08	1.12E+08	2.80E+07	

ANNEXE K (suite)

2 ième expérience: à 250 rpm et 32 °C

Boue+

TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/heure
0	2.20E+07	1.00E+00	2.20E+07	
3	2.30E+07	1.00E+00	2.30E+07	0.02
6	2.50E+07	1.00E+00	2.50E+07	0.04
9	2.85E+07	1.00E+00	2.85E+07	0.06
12	3.60E+07	1.00E+00	3.60E+07	0.08
15	4.70E+07	1.00E+00	4.70E+07	0.07
18	5.50E+07	5.00E+05	5.45E+07	0.05
21	6.40E+07	1.00E+07	5.40E+07	0.04
24	6.90E+07	1.35E+07	5.55E+07	0.03
27	7.60E+07	2.00E+07	5.60E+07	0.02
30	7.90E+07	2.40E+07	5.50E+07	0.02
33	8.50E+07	3.40E+07	5.10E+07	0.02
36	9.10E+07	4.00E+07	5.10E+07	0.02
39	9.70E+07	4.80E+07	4.90E+07	0.02
42	1.00E+08	5.40E+07	4.60E+07	0.02
45	1.07E+08	6.30E+07	4.40E+07	0.02
48	1.16E+08	7.40E+07	4.20E+07	0.02
51	1.22E+08	1.00E+08	2.20E+07	0.02
54	1.32E+08	1.21E+08	1.10E+07	0.02
57	1.38E+08	1.30E+08	8.00E+06	0.01
60	1.40E+08	1.33E+08	7.00E+06	0.00
63	1.41E+08	1.33E+08	8.00E+06	0.00
66	1.39E+08	1.32E+08	7.00E+06	0.00
69	1.40E+08	1.33E+08	7.00E+06	0.00
72	1.42E+08	1.34E+08	8.00E+06	

ANNEXE K (suite)

3 ième expérience: à 150 rpm et 32 °C

Boue Jonquière

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Celules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	3.85E+07	1.00E+00	3.85E+07	
3	4.00E+07	1.00E+00	4.00E+07	0.02
6	4.30E+07	1.00E+00	4.30E+07	0.02
9	4.60E+07	1.00E+00	4.60E+07	0.02
12	4.90E+07	1.00E+00	4.90E+07	0.02
15	5.20E+07	1.00E+00	5.20E+07	0.03
18	5.80E+07	1.00E+00	5.80E+07	0.05
21	6.90E+07	1.10E+07	5.80E+07	0.05
24	7.60E+07	1.60E+07	6.00E+07	0.02
27	8.00E+07	2.20E+07	5.80E+07	0.02
30	8.60E+07	3.40E+07	5.20E+07	0.02
33	9.20E+07	4.50E+07	4.70E+07	0.02
36	9.70E+07	6.60E+07	3.10E+07	0.01
39	1.00E+08	6.95E+07	3.05E+07	0.01
42	1.00E+08	7.20E+07	2.80E+07	0.01
45	1.04E+08	7.30E+07	3.10E+07	0.02
48	1.10E+08	7.50E+07	3.50E+07	0.00
51	1.01E+08	7.70E+07	2.40E+07	-0.01
54	1.06E+08	7.80E+07	2.80E+07	0.00
57	1.04E+08	7.70E+07	2.70E+07	0.00
60	1.08E+08	7.90E+07	2.90E+07	0.01
63	1.10E+08	7.80E+07	3.20E+07	0.00
66	1.08E+08	7.70E+07	3.10E+07	0.00
60	1.10E+08	7.90E+07	3.10E+07	0.00
72	1.10E+08	7.80E+07	3.20E+07	0.00
75	1.08E+08	7.70E+07	3.10E+07	0.00
78	1.09E+08	7.80E+07	3.10E+07	

ANNEXE K (suite)

3 ième expérience: à 150 rpm et 32 °C

Boue + TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , l/heure
0	3.75E+07	1.00E+00	3.75E+07	
3	3.80E+07	1.00E+00	3.80E+07	0.02
6	4.20E+07	1.00E+00	4.20E+07	0.03
9	4.45E+07	1.00E+00	4.45E+07	0.03
12	5.10E+07	1.00E+00	5.10E+07	0.04
15	5.70E+07	1.00E+00	5.70E+07	0.04
18	6.30E+07	1.00E+00	6.30E+07	0.05
21	7.50E+07	1.00E+00	7.50E+07	0.05
24	8.40E+07	5.25E+05	8.35E+07	0.04
27	9.40E+07	2.10E+07	7.30E+07	0.02
30	9.65E+07	3.20E+07	6.45E+07	0.01
33	9.80E+07	4.10E+07	5.70E+07	0.02
36	1.10E+08	5.75E+07	5.25E+07	0.01
39	1.01E+08	6.50E+07	3.60E+07	0.00
42	1.07E+08	6.90E+07	3.80E+07	0.01
45	1.05E+08	7.00E+07	3.50E+07	0.01
48	1.11E+08	7.10E+07	4.00E+07	0.00
51	1.03E+08	7.30E+07	3.00E+07	-0.02
54	1.01E+08	7.35E+07	2.75E+07	0.01
57	1.10E+08	7.50E+07	3.50E+07	0.00
60	1.00E+08	7.60E+07	2.40E+07	-0.01
63	1.02E+08	7.70E+07	2.50E+07	0.00
66	1.00E+08	7.60E+07	2.40E+07	0.00
69	9.90E+07	7.40E+07	2.50E+07	0.00
72	1.01E+08	7.60E+07	2.50E+07	0.00
75	1.00E+08	7.50E+07	2.50E+07	0.00
78	1.00E+08	7.40E+07	2.60E+07	

ANNEXE K (suite)

4 ième. Expérience: à 50 rpm et 32 °C

Boue Jonquière

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.30E+07	1.00E+00	1.30E+07	
3	1.35E+07	1.00E+00	1.35E+07	0.01
6	1.40E+07	1.00E+00	1.40E+07	0.01
9	1.45E+07	1.00E+00	1.45E+07	0.01
12	1.50E+07	1.00E+00	1.50E+07	0.02
15	1.60E+07	1.00E+00	1.60E+07	0.02
18	1.70E+07	1.00E+00	1.70E+07	0.02
21	1.76E+07	1.00E+00	1.76E+07	0.02
24	1.89E+07	2.20E+05	1.86E+07	0.02
27	1.94E+07	3.80E+05	1.90E+07	0.02
30	2.10E+07	4.70E+05	2.05E+07	0.02
33	2.20E+07	6.70E+05	2.13E+07	0.00
36	2.10E+07	9.30E+05	2.01E+07	0.00
39	2.20E+07	1.51E+06	2.05E+07	-0.01
42	2.00E+07	2.35E+06	1.77E+07	-0.02
45	2.00E+07	2.40E+06	1.76E+07	0.00
48	2.00E+07	2.51E+06	1.75E+07	0.00
51	1.99E+07	2.78E+06	1.71E+07	0.00
54	2.00E+07	3.02E+06	1.70E+07	0.00
57	1.97E+07	3.30E+06	1.64E+07	-0.01
60	1.84E+07	3.23E+06	1.52E+07	-0.01
63	1.90E+07	3.34E+06	1.57E+07	0.00
66	1.86E+07	3.30E+06	1.53E+07	0.00
60	1.94E+07	3.32E+06	1.61E+07	0.01
72	1.95E+07	3.20E+06	1.63E+07	0.00
75	1.98E+07	2.99E+06	1.68E+07	0.00
78	1.97E+07	3.10E+06	1.66E+07	0.00
81	1.97E+07	3.20E+06	1.65E+07	0.00
84	1.98E+07	3.10E+06	1.67E+07	0.00
87	1.98E+07	3.02E+06	1.68E+07	

ANNEXE K (suite)

4 ième. Expérience: à 50 rpm et 32 °C

Boue + TRIS

Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.75E+07	1.00E+00	1.75E+07	
3	1.80E+07	1.00E+00	1.80E+07	0.01
6	1.90E+07	1.00E+00	1.90E+07	0.01
9	1.90E+07	1.00E+00	1.90E+07	0.01
12	2.00E+07	1.00E+00	2.00E+07	0.02
15	2.15E+07	1.00E+00	2.15E+07	0.01
18	2.15E+07	1.00E+00	2.15E+07	0.00
21	2.15E+07	1.00E+00	2.15E+07	0.00
24	2.20E+07	1.00E+00	2.20E+07	0.00
27	2.20E+07	2.10E+05	2.18E+07	0.00
30	2.25E+07	5.50E+05	2.20E+07	0.01
33	2.30E+07	7.95E+05	2.22E+07	0.00
36	2.30E+07	1.16E+06	2.18E+07	0.00
39	2.30E+07	2.58E+06	2.04E+07	0.00
42	2.30E+07	2.65E+06	2.04E+07	0.00
45	2.35E+07	3.02E+06	2.05E+07	0.00
48	2.30E+07	3.22E+06	1.98E+07	0.00
51	2.35E+07	3.44E+06	2.01E+07	0.00
54	2.35E+07	3.58E+06	1.99E+07	0.00
57	2.38E+07	3.60E+06	2.02E+07	0.00
60	2.40E+07	3.65E+06	2.04E+07	0.00
63	2.40E+07	3.70E+06	2.03E+07	0.00
66	2.47E+07	3.65E+06	2.11E+07	0.00
69	2.40E+07	3.68E+06	2.03E+07	0.00
72	2.47E+07	3.67E+06	2.10E+07	0.01
75	2.50E+07	3.65E+06	2.14E+07	0.01
78	2.55E+07	3.70E+06	2.18E+07	0.00
81	2.45E+07	3.65E+06	2.09E+07	0.00
84	2.49E+07	3.60E+06	2.13E+07	0.00
87	2.45E+07	3.69E+06	2.08E+07	

ANNEXE L

Détermination du taux maximum spécifique de croissance

Expériences faites en ajoutant du glucose à la boue secondaire
de Black Lake (BLS)

Conditions des fermentation: 30 °C et 250 rpm

Sans dextrose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.10E+03	1.00E+00	2.10E+03	0.06
1	4.50E+03	1.00E+00	4.50E+03	0.09
1.5	2.00E+04	1.00E+00	2.00E+04	0.12
2	8.00E+04	1.00E+00	8.00E+04	0.07
2.5	1.00E+05	1.00E+00	1.00E+05	0.02
3	1.30E+05	1.00E+00	1.30E+05	

Boue avec 40 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.00E+04	1.00E+00	2.00E+04	0.24
1	2.90E+05	1.00E+00	2.90E+05	0.18
1.5	1.50E+06	2.00E+02	1.50E+06	0.14
2	7.60E+06	4.70E+04	7.55E+06	0.09
2.5	1.30E+07	8.00E+05	1.22E+07	0.05
3	2.30E+07	1.60E+07	7.00E+06	0.03
3.5	2.50E+07	1.60E+07	9.00E+06	

Boue avec 80 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.00E+04	1.00E+00	2.00E+04	0.24
1	3.20E+05	1.00E+00	3.20E+05	0.14
1.5	6.00E+05	1.00E+03	5.99E+05	0.09
2	2.50E+06	3.60E+05	2.14E+06	0.08
2.5	4.00E+06	1.50E+06	2.50E+06	0.08
3	1.85E+07	1.90E+06	1.66E+07	0.08
3.5	2.50E+07	2.00E+06	2.30E+07	

ANNEXE L (suite)

Boue avec 120 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.20E+04	1.00E+00	1.20E+04	0.24
1	2.90E+05	1.00E+00	2.90E+05	0.17
1.5	7.00E+05	5.00E+02	7.00E+05	0.12
2	5.40E+06	2.00E+05	5.20E+06	0.11
2.5	1.10E+07	7.00E+05	1.03E+07	0.07
3	2.60E+07	1.60E+06	2.44E+07	0.04
3.5	3.00E+07	7.00E+06	2.30E+07	

Boue avec 160 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	6.00E+04	1.00E+00	6.00E+04	0.27
1	7.00E+05	1.00E+00	7.00E+05	0.18
1.5	5.00E+06	2.00E+02	5.00E+06	0.09
2	6.30E+06	5.70E+04	6.24E+06	0.03
2.5	1.10E+07	7.00E+05	1.03E+07	0.05
3	2.00E+07	6.70E+06	1.33E+07	0.03
3.5	2.20E+07	1.50E+07	7.00E+06	

Boue avec 200 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.10E+04	1.00E+00	2.10E+04	0.25
1	4.50E+05	1.00E+00	4.50E+05	0.17
1.5	1.30E+06	1.50E+02	1.30E+06	0.10
2	4.50E+06	3.80E+04	4.46E+06	0.08
2.5	8.50E+06	2.00E+05	8.30E+06	0.06
3	1.85E+07	1.20E+06	1.73E+07	0.04
3.5	2.50E+07	6.00E+06	1.90E+07	

ANNEXE L (suite)

Expériences faites en ajoutant du glucose et de l'extrait de levure (40 mg/L) à la boue secondaire de Black Lake (BLS)

Conditions des fermentation: 30 °C et 250 rpm

40 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.80E+04	1.00E+00	2.80E+04	0.35
1	4.50E+06	1.00E+00	4.50E+06	0.22
1.5	5.20E+06	2.00E+03	5.20E+06	0.04
2	1.20E+07	3.80E+06	8.20E+06	0.04
2.5	1.50E+07	8.00E+06	7.00E+06	0.04
3	3.50E+07	1.50E+07	2.00E+07	0.04
3.5	4.20E+07	3.00E+07	1.20E+07	

80 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	8.00E+04	1.00E+00	8.00E+04	0.35
1	5.00E+06	1.00E+00	5.00E+06	0.22
1.5	1.50E+07	2.00E+03	1.50E+07	0.08
2	3.20E+07	3.50E+06	2.85E+07	0.04
2.5	4.00E+07	1.00E+07	3.00E+07	0.02
3	4.70E+07	2.90E+07	1.80E+07	0.01
3.5	5.50E+07	5.00E+07	5.00E+06	

120 mg/L de glucose

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.50E+04	1.00E+00	2.50E+04	0.35
1	4.00E+06	1.00E+00	4.00E+06	0.18
1.5	2.00E+06	8.00E+02	2.00E+06	0.05
2	1.48E+07	3.70E+05	1.44E+07	0.09
2.5	1.80E+07	9.00E+05	1.71E+07	0.04
3	4.30E+07	2.40E+06	4.06E+07	0.05
3.5	6.20E+07	1.00E+07	5.20E+07	

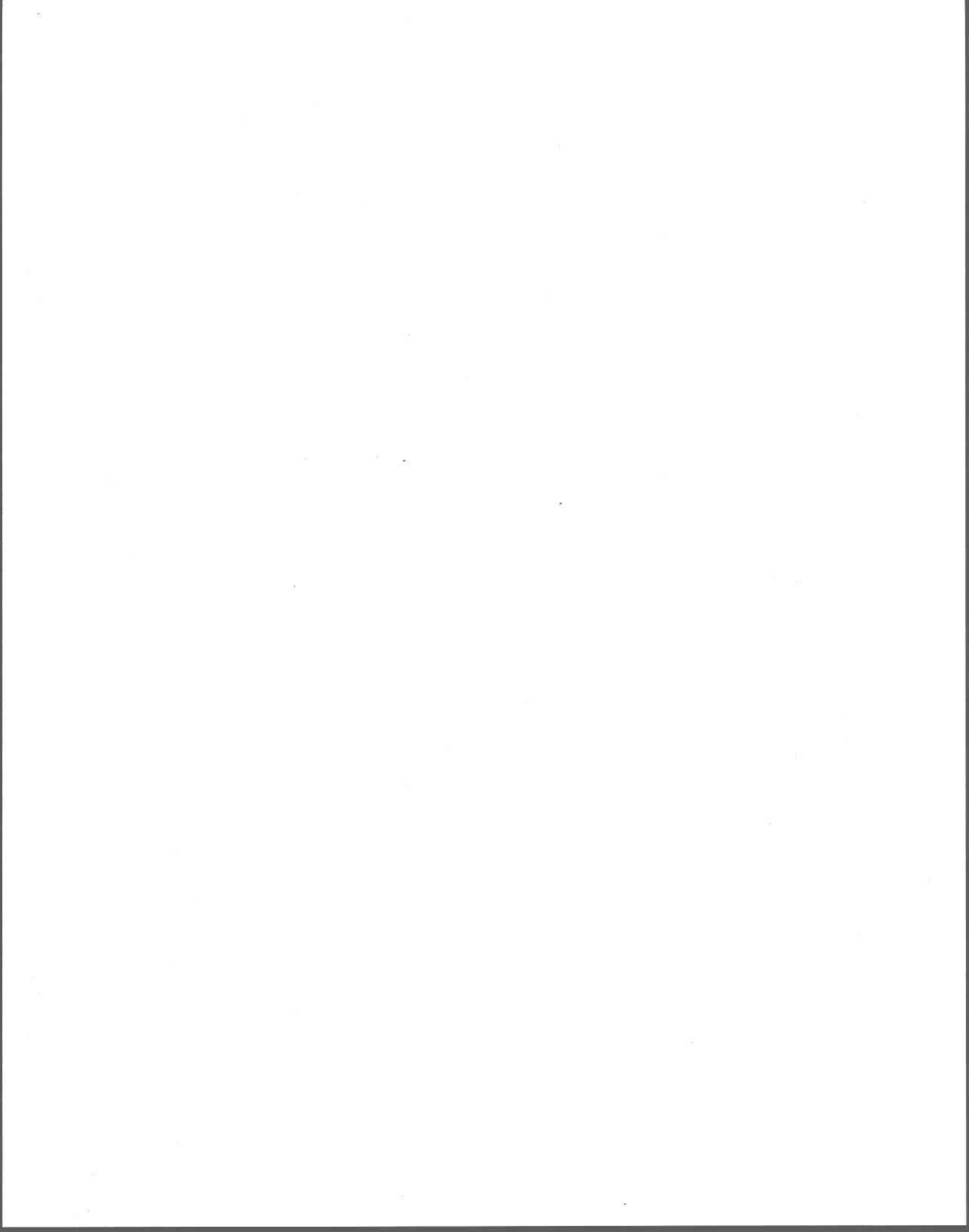
ANNEXE L (suite)

160 mg/L de glucose

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
1.5	9.00E+04	1.00E+00	9.00E+04	0.36
1	6.30E+06	1.00E+00	6.30E+06	0.23
1.5	2.00E+07	2.50E+03	2.00E+07	0.10
2	7.50E+07	3.50E+06	7.15E+07	0.06
2.5	9.00E+07	2.00E+07	7.00E+07	0.01
3	1.00E+08	6.90E+07	3.10E+07	0.01
3.5	1.10E+08	8.50E+07	2.50E+07	

200 mg/L de glucose

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	8.00E+04	1.00E+00	8.00E+04	0.36
1	6.00E+06	1.00E+00	6.00E+06	0.23
1.5	2.00E+07	2.50E+03	2.00E+07	0.11
2	8.20E+07	5.50E+06	7.65E+07	0.06
2.5	9.00E+07	2.00E+07	7.00E+07	0.01
3	9.85E+07	7.20E+07	2.65E+07	0.01
3.5	1.20E+08	8.00E+07	4.00E+07	



ANNEXE G (suite)

Boue: Pâtes et papiers
(PPS)

pH initial= 6.5; pH final 8.5

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	1.30E+04	1.00E+00	1.30E+04	0.22
1	2.00E+05	1.00E+00	2.00E+05	0.17
1.5	8.00E+05	1.00E+00	8.00E+05	0.13
2	5.00E+06	1.00E+00	5.00E+06	0.13
2.5	1.70E+07	1.00E+00	1.70E+07	0.10
3	5.50E+07	1.00E+00	5.50E+07	

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 8.5

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	3.80E+04	1.00E+00	3.80E+04	0.30
1	1.50E+06	1.00E+00	1.50E+06	0.22
1.5	8.00E+06	1.00E+00	8.00E+06	0.15
2	5.00E+07	1.00E+00	5.00E+07	0.09
2.5	6.50E+07	1.00E+00	6.50E+07	0.02
3	8.50E+07	1.00E+00	8.50E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	3.10E+03	1.00E+00	3.10E+03	0.10
1	1.10E+04	1.00E+00	1.10E+04	0.12
1.5	5.00E+04	1.00E+00	5.00E+04	0.13
2	2.50E+05	1.00E+00	2.50E+05	0.09
2.5	4.50E+05	1.00E+02	4.50E+05	0.05
3	8.50E+05	5.00E+03	8.45E+05	

ANNEXE G (suite)

Boue: Pâtes et papiers (PPRMS)

pH initial= 6.5; pH final 8.5

Non hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.80E+03	1.00E+00	2.80E+03	0.09
1	8.30E+03	1.00E+00	8.30E+03	0.19
1.5	2.50E+05	1.00E+00	2.50E+05	0.28
2	6.50E+06	1.00E+00	6.50E+06	0.15
2.5	8.50E+06	1.00E+00	8.50E+06	0.02
3	1.10E+07	1.00E+00	1.10E+07	

Hydrolysée

pH initial= 7.0; pH final 8.5

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.90E+04	1.00E+00	2.90E+04	0.29
1	9.50E+05	1.00E+00	9.50E+05	0.23
1.5	6.50E+06	1.00E+00	6.50E+06	0.16
2	4.20E+07	1.00E+00	4.20E+07	0.09
2.5	5.00E+07	1.00E+00	5.00E+07	0.01
3	5.50E+07	1.00E+00	5.50E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	3.10E+03	1.00E+00	3.10E+03	0.10
1	1.00E+04	1.00E+00	1.00E+04	0.10
1.5	3.50E+04	1.00E+00	3.50E+04	0.11
2	1.25E+05	1.00E+00	1.25E+05	0.09
2.5	2.90E+05	1.00E+01	2.90E+05	0.07
3	6.50E+05	1.00E+02	6.50E+05	

ANNEXE G (suite)

Boue: Valcartier (ValP)

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Hydrolysée

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.00E+03	1.00E+00	2.00E+03	0.06
1	4.00E+03	1.00E+00	4.00E+03	0.04
1.5	5.50E+03	1.00E+00	5.50E+03	0.02
2	7.00E+03	1.00E+00	7.00E+03	0.09
2.5	5.00E+04	1.00E+00	5.00E+04	0.16
3	3.20E+05	1.00E+00	3.20E+05	0.16
3.5	2.50E+06	1.00E+00	2.50E+06	0.18
4	2.20E+07	1.00E+00	2.20E+07	0.09
4.5	2.30E+07	7.00E+02	2.30E+07	0.01
5	2.50E+07	1.40E+05	2.49E+07	

Surnageant

pH initial= 7.0; pH final 8.0

Jour	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	1.00E+03	1.00E+00	9.99E+02	
0.5	2.00E+03	1.00E+00	2.00E+03	0.06
1	4.00E+03	1.00E+00	4.00E+03	0.04
1.5	5.60E+03	1.00E+00	5.60E+03	0.03
2	8.00E+03	1.00E+00	8.00E+03	0.08
2.5	3.80E+04	6.00E+03	3.20E+04	0.13
3	1.70E+05	6.00E+04	1.10E+05	0.11
3.5	5.50E+05	2.00E+05	3.50E+05	0.10
4	1.80E+06	6.30E+05	1.17E+06	

ANNEXE H

Calculs pour la détermination du taux maximum spécifique de croissance (μ , 1/h)
de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière.

Expériences réalisées à différents pH et températures

Expériences à pH=7 et 30 °C

Jour	Compte total (UFC/mL)	Compte de spores (UFC/mL)	Cellules végétatives (UFC/mL)	μ , 1/h
0	1.10E+07	1.00E+00	1.10E+07	
0.5	3.00E+07	9.00E+03	3.00E+07	0.08
1	7.10E+07	5.70E+07	1.40E+07	0.05
1.5	1.00E+08	8.00E+07	2.00E+07	0.03
2	1.50E+08	1.00E+08	5.00E+07	0.02
2.5	1.60E+08	1.10E+08	5.00E+07	0.01
3	1.76E+08	1.21E+08	5.50E+07	-0.01
3.5	1.40E+08	1.20E+08	2.00E+07	

Expériences à pH=7 et 32 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	2.30E+07	1.00E+00	2.30E+07	
0.5	7.00E+07	9.00E+03	7.00E+07	0.10
1	2.30E+08	8.50E+07	1.45E+08	0.05
1.5	2.40E+08	1.50E+08	9.00E+07	0.01
2	2.90E+08	2.47E+08	4.30E+07	0.00
2.5	2.70E+08	1.90E+08	8.00E+07	0.00
3	2.59E+08	1.27E+08	1.32E+08	-0.02
3.5	1.70E+08	9.00E+07	8.00E+07	

Expériences à pH=7 et 34 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	2.02E+07	1.00E+00	2.02E+07	
0.5	3.00E+07	7.00E+03	3.00E+07	0.04
1	5.80E+07	4.40E+07	1.40E+07	0.04
1.5	7.00E+07	4.10E+07	2.90E+07	0.01
2	7.60E+07	4.00E+07	3.60E+07	0.01
2.5	9.00E+07	4.00E+07	5.00E+07	0.01
3	1.02E+08	4.50E+07	5.70E+07	0.00
3.5	9.80E+07	4.60E+07	5.20E+07	

ANNEXE H (suite)

Expériences à pH=7 et 36 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, 1/h$
0	2.04E+07	1.00E+00	2.04E+07	
0.5	3.00E+07	3.50E+03	3.00E+07	0.03
1	4.20E+07	1.70E+07	2.50E+07	0.02
1.5	4.40E+07	2.80E+07	1.60E+07	0.00
2	4.40E+07	4.20E+07	2.00E+06	

Expériences à pH=6 et 30 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, 1/h$
0	2.10E+07	1.00E+00	2.10E+07	
0.5	5.00E+07	1.00E+04	5.00E+07	0.08
1	1.36E+08	1.18E+08	1.80E+07	0.06
1.5	2.00E+08	1.70E+08	3.00E+07	0.03
2	2.68E+08	2.02E+08	6.60E+07	0.00
2.5	1.80E+08	1.00E+08	8.00E+07	-0.03
3	1.24E+08	5.70E+07	6.70E+07	

Expériences à pH=6 et 32 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, 1/h$
0	2.20E+07	1.00E+00	2.20E+07	
0.5	6.00E+07	1.00E+04	6.00E+07	0.09
1	1.80E+08	1.09E+08	7.10E+07	0.05
1.5	2.10E+08	1.70E+08	4.00E+07	0.02
2	2.60E+08	1.50E+08	1.10E+08	0.01
2.5	2.60E+08	1.70E+08	9.00E+07	-0.01
3	2.30E+08	2.00E+08	3.00E+07	-0.01
3.5	2.10E+08	2.00E+08	1.00E+07	

ANNEXE H (suite)

Expériences à pH=6 et 34 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, l/h$
0	2.32E+07	1.00E+00	2.32E+07	
0.5	4.00E+07	5.00E+03	4.00E+07	0.05
1	7.40E+07	2.60E+07	4.80E+07	0.03
1.5	9.00E+07	3.00E+07	6.00E+07	0.02
2	1.18E+08	3.50E+07	8.30E+07	0.00
2.5	9.00E+07	3.10E+07	5.90E+07	-0.02
3	6.80E+07	3.10E+07	3.70E+07	-0.01
3.5	6.60E+07	3.30E+07	3.30E+07	

Expériences à pH=6 et 36 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, l/h$
0	2.70E+07	1.00E+00	2.70E+07	
0.5	4.00E+07	5.00E+03	4.00E+07	0.04
1	6.90E+07	4.20E+07	2.70E+07	0.04
1.5	1.00E+08	5.50E+07	4.50E+07	0.02
2	1.17E+08	6.80E+07	4.90E+07	0.00
2.5	9.00E+07	6.00E+07	3.00E+07	-0.02
3	6.70E+07	4.70E+07	2.00E+07	

Expériences à pH=4 et 30 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	$\mu, l/h$
0	2.15E+07	1.00E+00	2.15E+07	
0.5	6.00E+07	1.00E+04	6.00E+07	0.09
1	1.80E+08	8.00E+07	1.00E+08	0.05
1.5	2.10E+08	1.80E+08	3.00E+07	0.02
2	2.74E+08	1.81E+08	9.30E+07	0.00
2.5	2.00E+08	1.30E+08	7.00E+07	-0.03
3	1.41E+08	1.40E+08	1.00E+06	-0.02
3.5	1.35E+08	1.20E+08	1.50E+07	

ANNEXE H (suite)

Expériences à pH=4 et 32 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	5.90E+06	1.00E+00	5.90E+06	
0.5	1.90E+07	7.00E+03	1.90E+07	0.09
1	5.30E+07	4.10E+07	1.20E+07	0.06
1.5	8.00E+07	6.00E+07	2.00E+07	0.03
2	1.12E+08	9.90E+07	1.30E+07	0.03
2.5	1.50E+08	1.10E+08	4.00E+07	0.02
3	2.00E+08	1.26E+08	7.40E+07	0.01
3.5	1.90E+08	1.50E+08	4.00E+07	

Expériences à pH=4 et 34 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	1.54E+07	1.00E+00	1.54E+07	
0.5	3.10E+07	8.00E+03	3.10E+07	0.05
1	5.00E+07	3.70E+07	1.30E+07	0.05
1.5	1.00E+08	4.00E+07	6.00E+07	0.05
2	1.60E+08	3.80E+07	1.22E+08	0.01
2.5	1.30E+08	3.00E+07	1.00E+08	-0.02
3	8.90E+07	4.00E+07	4.90E+07	-0.02
3.5	7.90E+07	3.00E+07	4.90E+07	

Expériences à pH=4 et 36 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	2.28E+07	1.00E+00	2.28E+07	
0.5	3.00E+07	4.00E+03	3.00E+07	0.02
1	3.60E+07	2.00E+07	1.60E+07	0.02
1.5	5.00E+07	3.50E+07	1.50E+07	0.02
2	6.30E+07	4.00E+07	2.30E+07	0.02
2.5	8.00E+07	4.50E+07	3.50E+07	0.02
3	1.08E+08	4.50E+07	6.30E+07	0.01
3.5	1.00E+08	4.90E+07	5.10E+07	

ANNEXE H (suite)

Expériences à pH=2 et 30 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	1.57E+07	1.00E+00	1.57E+07	
0.5	4.00E+07	8.00E+03	4.00E+07	0.05
1	5.00E+07	3.00E+07	2.00E+07	0.03
1.5	8.00E+07	5.00E+07	3.00E+07	0.03
2	1.10E+08	4.10E+07	6.90E+07	0.02
2.5	1.30E+08	7.00E+07	6.00E+07	0.02
3	1.70E+08	1.15E+08	5.50E+07	0.01
3.5	1.60E+08	1.00E+08	6.00E+07	

Expériences à pH=2 et 32 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	1.60E+07	1.00E+00	1.60E+07	
0.5	5.00E+07	1.10E+04	5.00E+07	0.10
1	1.59E+08	1.29E+08	3.00E+07	0.06
1.5	1.90E+08	1.30E+08	6.00E+07	0.01
2	1.92E+08	1.41E+08	5.10E+07	0.00
2.5	1.70E+08	1.30E+08	4.00E+07	-0.02
3	1.33E+08	1.10E+08	2.30E+07	-0.01
3.5	1.30E+08	1.00E+08	3.00E+07	

Expériences à pH=2 et 34 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	1/h
0	1.87E+07	1.00E+00	1.87E+07	
0.5	4.00E+07	1.00E+00	4.00E+07	0.06
1	8.50E+07	1.00E+00	8.50E+07	0.03
1.5	9.00E+07	1.00E+04	9.00E+07	0.00
2	9.40E+07	8.80E+07	6.00E+06	

Expériences à pH=2 et 36 °C

Jour	Compte total	Compte de spores	Cellules végétatives	μ , 1/h
0	2.10E+07	1.00E+00	2.10E+07	
0.5	4.00E+07	1.00E+00	4.00E+07	0.05
1	6.50E+07	1.00E+00	6.50E+07	0.03
1.5	9.00E+07	9.00E+03	9.00E+07	0.03
2	1.23E+08	2.70E+07	9.60E+07	0.00
2.5	1.00E+08	4.20E+07	5.80E+07	

ANNEXE I

Calculs du taux maximum spécifique de croissance de *B. thuringiensis* dans la boue de Jonquière sans ou avec contrôle du pH

Sans tampon				
Heure	Compte total UFC/mL	Compte de spores UFC/mL	Cellules végétatives UFC/mL	μ , 1/h
0	2.70E+07	1.00E+00	2.70E+07	
3	2.90E+07	1.00E+00	2.90E+07	0.02
6	3.00E+07	1.00E+00	3.00E+07	0.02
9	3.20E+07	1.00E+00	3.20E+07	0.02
12	3.40E+07	1.00E+00	3.40E+07	0.08
15	5.10E+07	1.00E+00	5.10E+07	0.08
18	5.40E+07	5.00E+05	5.35E+07	0.04
21	6.50E+07	1.00E+07	5.50E+07	0.04
24	6.90E+07	1.70E+07	5.20E+07	0.03
27	7.90E+07	2.60E+07	5.30E+07	0.03
30	8.40E+07	4.00E+07	4.40E+07	0.03
33	9.50E+07	5.20E+07	4.30E+07	0.03
36	1.00E+08	6.00E+07	4.00E+07	0.03
39	1.12E+08	6.75E+07	4.45E+07	0.03
42	1.20E+08	7.85E+07	4.15E+07	0.02
45	1.25E+08	8.20E+07	4.30E+07	0.01
48	1.30E+08	9.00E+07	4.00E+07	0.01
51	1.36E+08	9.80E+07	3.80E+07	0.01
54	1.38E+08	1.02E+08	3.60E+07	0.01
57	1.41E+08	1.04E+08	3.70E+07	0.00
60	1.38E+08	1.06E+08	3.20E+07	0.00
63	1.41E+08	1.10E+08	3.10E+07	0.00
66	1.40E+08	1.12E+08	2.80E+07	0.00
69	1.42E+08	1.14E+08	2.80E+07	0.00
72	1.40E+08	1.12E+08	2.80E+07	