

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre Eau Terre Environnement

**MISE À L'ÉCHELLE DE LA PRODUCTION DU BIOPESTICIDE  
*BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *KURSTAKI* AVEC COMME  
SUBSTRAT DES EAUX USÉES D'AMIDON**

Par :

Adama Ndao

Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maître ès sciences, M.Sc en  
Sciences de l'eau et de l'environnement

INRS-ISHÉDD

**Jury d'évaluation**

|                        |                       |            |
|------------------------|-----------------------|------------|
| Examineur interne      | Guy Mercier           | (INRS-ETE) |
| Examineur externe      | Richard Trudel        | (SOPFIM)   |
| Directeur de recherche | Rajeshwar Dayal Tyagi | (INRS-ETE) |



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, **M. Rajeshwar Dayal Tyagi**, qui n'a ménagé aucun effort pour ma réussite universitaire. Sa rigueur scientifique, ses conseils et sa disponibilité m'ont permis de réaliser mon projet de recherche, portant sur un domaine d'étude crucial dans l'effort de préserver l'environnement.

Je tiens également à remercier **M. Kamal El Haji**, directeur de l'Institut supérieur des hautes études en développement durable (ISHÉDD), pour son soutien, ses conseils et sa volonté affichée pour la réussite de ses étudiants. La correction qu'il a apporté à ce présent mémoire est inestimable.

Je remercie le **Dr Jean Robert Gnepe** pour sa présence, ses conseils, son dévouement et pour sa supervision sans relâche de ce présent mémoire.

Je remercie avec vigueur tout le personnel de l'**INRS** et de l'**ISHÉDD** pour leurs contributions aux résultats obtenus dans ce mémoire.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, qui ont favorisé mon éducation dans un environnement sain et propice à la réussite.



## RÉSUMÉ

La protection des forêts et des cultures contre les insectes ravageurs a entraîné l'utilisation abusive de pesticides chimiques, qui se sont avérés néfastes pour la santé (des humains et des animaux), l'environnement et souvent inefficaces dans la lutte contre les insectes. À cet effet, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus recommandée grâce à son efficacité et à l'absence d'impacts négatifs sur l'environnement. Le *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 représente le biopesticide le plus utilisé et le plus efficace dans la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE). Afin de garder cette dynamique, il est important de tenir en compte les coûts de production et d'apporter une valeur ajoutée au biopesticide. L'utilisation des eaux usées d'industrie d'amidon, en tant que substrat pour le Btk, permet de relever les défis, économique et environnemental.

L'objectif de ce travail consiste, dans un premier lieu, à produire de la biomasse de Btk dans des fermenteurs de 15L, 150L et 2000L en utilisant, comme substrat nutritif, des eaux usées d'amidon. Il faudra par la suite s'assurer de la reproductibilité des résultats de fermentation obtenus, sur les fermenteurs de 15L, 150L et 2000L. L'évaluation des problèmes rencontrés sur les bioréacteurs de 150L et de 2000L, et les solutions apportées, seront décrites par la suite.

La production du biopesticide Bioval (*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1) est soumise à plusieurs paramètres de contrôle tels que le contrôle du pH ( $7 \pm 0,1$ ), la température ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ), l'oxygène dissous ( $\geq 30 \pm 1\%$ ), le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) et la composition du milieu de culture.

Les résultats obtenus après la mise à l'échelle et la résolution des problèmes de contamination sont en termes de  $K_{La}$ , plus importants pour le 2000L, cellules ( $0,409.10^9 \pm 0,04$  UFC/ml pour le 15L,  $0,513.10^9 \pm 0,05$  UFC/ml pour le 150 L et  $0,715.10^9 \pm 0,07$  UFC/ml pour le 2000 L), spores ( $0,319.10^9 \pm 0,03$  UFC/ml pour le 15L,  $0,409.10^9 \pm 0,04$  UFC/ml pour le 150 L et  $0,705.10^9 \pm 0,07$  UFC/ml pour le 2000 L), delta endotoxines ( $333 \pm 33$  µg/ml pour le 15L,  $369 \pm 37$  µg/ml pour le 150 L et  $381,72 \pm 38$  µg/ml pour le 2000 L) et entomotoxiques ( $20219 \pm 2099$  UI/µL pour le 15L,  $24115$  UI/ µL pour le 150 L

et 22444 UI/ $\mu$ L pour le 2000 L). Ces résultats du biopesticide Bioval, (biopesticide Btk produit avec les EUA) sont intéressants comparés au Foray 76 B (biopesticide standard utilisé sur le marché comme référence).

En conclusion, les résultats observés sont dans l'ensemble excellents pour le fermenteur de 2000L en termes de  $K_{La}$ , spores, de cellules, de delta endotoxine et de potentiel entomotoxique.

**Mots clés :** Eaux usées d'amidon, *Bacillus thuringiensis*, mise à l'échelle, fermentation 2000L, 150L, 15L, formulation, entomotoxicité, Delta-endotoxine, Bioval.

# TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| REMERCIEMENTS                                                                        | iii       |
| RÉSUMÉ                                                                               | v         |
| TABLE DES MATIÈRES                                                                   | vii       |
| LISTE DES FIGURES                                                                    | xiii      |
| LISTE DES TABLEAUX                                                                   | xv        |
| INTRODUCTION                                                                         | 1         |
| 1. REVUE DE LITTÉRATURE                                                              | 4         |
| <b>1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i></b>                                             | <b>4</b>  |
| 1.1.1 Distribution de Bt                                                             | 5         |
| 1.1.2 Formation des spores (sporulation)                                             | 6         |
| 1.1.3 Rôle des spores et de leur paroi sur les insectes nuisibles                    | 7         |
| 1.1.4 Synthèse des delta-endotoxines (protéines Cry) actives contre les lépidoptères | 7         |
| 1.1.5 Protéines insecticides végétatives (VIPs)                                      | 11        |
| 1.1.6 Chitinases                                                                     | 11        |
| 1.1.7 Protéases de Bt                                                                | 12        |
| 1.1.8 Inhibiteurs immunitaires contre Bt                                             | 13        |
| 1.1.9 Beta-exotoxine ( $\beta$ -exotoxine)                                           | 14        |
| 1.1.10 Zwittermicine A                                                               | 14        |
| <b>1.2 Paramètres de fermentation</b>                                                | <b>15</b> |
| 1.2.1 La composition du milieu de culture                                            | 15        |
| 1.2.2 Température et pH de fermentation                                              | 16        |
| 1.2.3 Optimisation de l'inoculum                                                     | 16        |
| 1.2.4 Transfert d'oxygène                                                            | 17        |
| 1.2.5 Agitation du milieu                                                            | 18        |
| <b>1.3 Techniques de formulation</b>                                                 | <b>22</b> |
| 1.3.1 Récolte - Centrifugation et autres                                             | 22        |
| 1.3.2 Formulations des biopesticides                                                 | 23        |
| <b>1.4 Mise à l'échelle</b>                                                          | <b>25</b> |
| <b>1.5 Problématique</b>                                                             | <b>26</b> |
| 2. Objectif de recherche                                                             | 26        |

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Originalité de la recherche                                                                                    | 28 |
| 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES                                                                                            | 29 |
| 3.1 Souche <i>Bacillus thuringiensis</i>                                                                           | 29 |
| 3.2 Préparation de l'inoculum                                                                                      | 29 |
| 3.2.1 Test de fiabilité et d'efficacité de l'inoculum durant la fermentation de l'erlenmeyer au bioréacteur de 15L | 29 |
| 3.3 Milieu de croissance de Btk                                                                                    | 30 |
| 3.4 Problèmes de contaminations microbiennes issus des fermenteurs de 150L et de 2000 L                            | 31 |
| 3.5 Fermentation dans les bioréacteurs de 15L, 150L et 2000L                                                       | 32 |
| 3.5.1 Détermination du coefficient $K_{La}$ , OUR et OTR                                                           | 33 |
| 3.6 Estimation des cellules totales et des spores viables                                                          | 34 |
| 3.7 Taux de croissance maximale                                                                                    | 34 |
| 3.8 Biopesticide Bioval                                                                                            | 35 |
| 3.9 Technique de bioessais                                                                                         | 37 |
| 3.9.1 Estimation de la production de delta endotoxine                                                              | 38 |
| 3.9.2 Taille des particules                                                                                        | 39 |
| 3.9.3 Potentiel zêta                                                                                               | 39 |
| 3.9.4 Viscosité                                                                                                    | 41 |
| 3.9.5 Solides totaux                                                                                               | 41 |
| 3.9.6 Matières en suspension                                                                                       | 42 |
| 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION                                                                                         | 43 |
| 4.1 Test de fiabilité et d'efficacité de l'inoculum                                                                | 43 |
| 4.2 Concentration en mmol/l.h de l'OTR, l'OUR et le $K_{La}$ dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L            | 47 |
| 4.3 Concentration des cellules totales et des spores viables                                                       | 49 |
| 4.4 Taux de croissance maximale                                                                                    | 50 |
| 4.5 Concentration de delta endotoxine dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L.                                  | 51 |
| 4.6 Entomotoxicité                                                                                                 | 52 |
| 4.7. Paramètres physiques du biopesticide Bioval                                                                   | 53 |
| 4.8 Résultats des problèmes rencontrés dans les fermenteurs                                                        | 55 |
| 5. CONCLUSION                                                                                                      | 60 |
| 6. RECOMMANDATIONS                                                                                                 | 62 |



|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. RÉFÉRENCES                                                                                                                                            | 63 |
| <i>Annexe 1 : Concentration en mmol/l.h de l'OTR, l'OUR et le <math>K_{La}</math> dans les fermenteurs de 2000L, 150L et de 15L (Figure 10 pages 45)</i> | 76 |
| <i>Annexe 2 : Concentration des cellules totales, spores viables (Figure 11 page 47)</i>                                                                 | 77 |
| <i>Annexe 3 : Concentration delta endotoxine (ug/ml) dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L (Figure 12 page 50)</i>                                  | 78 |



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Bt : *Bacillus thuringiensis*

Btk : *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

EUA : eaux usées d'amidon

$K_{La}$  : coefficient de transfert volumétrique

OUR : taux d'utilisation de l'oxygène

OTR : taux de transfert de l'oxygène

Tx : entomotoxicité

UFC : unité formatrice de colonie

ICPs : cristaux protéiques insecticides

TBE : tordeuse des bourgeons de l'épinette

UI : unité internationale

VIPS : protéines insecticides végétatives



## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Colonie de <i>Bacillus thuringiensis</i> à 18h de fermentation (a) et à 48h de fermentation (b).....                                                                       | 4  |
| Figure 2 : Microscopie électronique de <i>Bacillus thuringiensis</i> au cours de la sporulation. L'inclusion parasporale noire est le cristal insecticide .....                       | 8  |
| Figure 3 : Mécanisme de la toxicité des protéines Cry de Bt (modifié à partir de Whalon et Wingerd, 2003). .....                                                                      | 10 |
| Figure 4 : Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995). 18                                                                                          |    |
| Figure 5 : Distribution des bulles d'air en fonction de l'agitation et du flux d'air (Doran, 1995).....                                                                               | 20 |
| Figure 6 : Contamination microbienne du bouillon fermenté (a) vue microscopique et (b) boîte de Pétri (milieu Tryptic Soya Agar).....                                                 | 31 |
| Figure 7 : Évaluation de l'entomotoxicité de Btk HD-1 sur les larves de TBE .....                                                                                                     | 38 |
| Figure 8 : Étude comparative de la croissance de Btk dans 2 milieux initiaux (EUA et TSB) et un milieu final EUA.....                                                                 | 43 |
| Figure 9 : Étude comparative des cellules et des spores dans le bioréacteur de 15L dans un milieu TSB de départ et un milieu final EUA. ....                                          | 46 |
| Figure 10 : Profils du $K_{La}$ , OUR et OTR durant la fermentation des EUA de 15 L et 150 L et 2000 L (erreur de la méthode:10%). ....                                               | 48 |
| Figure 11 : Profils de la croissance cellulaire et de la sporulation de Btk HD-1 au cours de la fermentation en bioréacteur de 150L et 15L (erreurs de la méthode : 10% à 11%). ..... | 49 |
| Figure 12 : Concentration de delta endotoxine dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L (erreur de la méthode 5%).....                                                               | 52 |
| Figure 13 : Bouillon fermenté après 48h de fermentation sans contamination microbienne :(a) boîte de Pétri (milieu Tryptic Soya Agar) et (b) vue microscopique.....                   | 56 |
| Figure 14 : Photos représentant les changements opérés sur le fermenteur de 150L. ...                                                                                                 | 57 |
| Figure 15 : Photo représentant la ligne reliant le fond du fermenteur au drain. ....                                                                                                  | 58 |



## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Classification actuelle de 67 <i>Bacillus thuringiensis</i> sous-espèces en fonction des flagelles (H) antigènes..... | 5  |
| Tableau 2 : Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée. ....                                | 21 |
| Tableau 3 : Caractéristique des eaux usées d'amidon (EUA).....                                                                    | 31 |
| Tableau 4 : Additifs utilisés pour la préparation de la formulation pour un volume de 100L. ....                                  | 36 |
| Tableau 5 : Techniques de bioessais de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE). ....                                        | 37 |
| Tableau 6 : Potentiel zêta (mV) et stabilité du colloïde. ....                                                                    | 41 |
| Tableau 7 : Paramètres de culture de Btk durant la fermentation en Erlenmeyer. ....                                               | 44 |
| Tableau 8 : Paramètres de culture de Btk durant la fermentation en 15L.....                                                       | 45 |
| Tableau 9 : Mesure du taux de croissance cellulaire maximale en h-1 dans les 3 fermenteurs.....                                   | 51 |
| Tableau 10 : Concentration de l'entomotoxicité avec Bioval produit dans le 15L et le 150L.....                                    | 53 |
| Tableau 11 : Paramètres comparatifs après fermentation. ....                                                                      | 54 |





## INTRODUCTION

La protection des forêts et des cultures contre les insectes ravageurs a entraîné l'utilisation abusive de pesticides chimiques. L'usage de ces insecticides chimiques, engendre des impacts néfastes pour la santé des humains et des animaux, l'environnement et s'avère inefficace contre les insectes avec le temps (Lindquist, 2000). Face à cette problématique, les biopesticides se présentent comme le meilleur moyen alternatif de lutte contre les insectes. Ces biopesticides demeurent moins coûteux, efficaces et sans risque pour l'environnement et la santé humaine (Yezza, 2005).

En effet, pour diminuer la dépendance du secteur agricole aux pesticides chimiques, l'utilisation des biopesticides s'avère de plus en plus efficace et recommandée (Yezza, 2005). Parmi les biopesticides les plus utilisés dans le monde, le *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Btk) est le plus efficace dans la lutte contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) (*Lepidoptera* : (*choristoreuna fumiferena*)), qui est le principal ravageur des forêts de sapins et d'épinettes au Canada (Glare et O'Callaghan, 2000; Valéro *et al.*, 1999). L'utilisation de Btk comme insecticide commercial est justifiée par sa capacité à produire de grandes quantités de protéines larvicides. Ces dernières sont contenues dans les inclusions cristallines para-sporales formées durant la sporulation de Btk (Schnepf *et al.*, 1998). La diversité des protéines cristallines des insecticides, synthétisées par différentes souches de Bt, a permis son utilisation pour la lutte biologique en agriculture, en sylviculture et pour la santé publique. La lutte biologique est de plus en plus importante dans les stratégies qui visent une gestion intégrée des organismes nuisibles (Ben-Dov *et al.*, 1997).

Cependant, l'utilisation des biopesticides à base de Btk est limitée en raison du prix élevé de sa production. Par conséquent, l'emploi de nouvelles matières premières (eaux usées agroalimentaires ou municipales) en tant que matrice nutritionnelle pour Btk permettent de baisser considérablement les coûts engendrés par à cette activité. Les eaux usées de l'industrie d'amidon (EUA), obtenues d'ADM-Ogilvie (Candiac, Québec, Canada), sont similaires à celles, produites en grandes quantités dans le monde (Rajbhandari et Annachhatre, 2004). Ces EUA ont une forte charge en demande chimique en oxygène (DCO), due à la présence de carbone et de plusieurs sources

d'azote (amidon, gluten, protéines, fibres et autres minéraux), ce qui pose un sérieux problème de traitement de ces eaux usées ainsi que élimination dans l'environnement.

À cet effet, les EUA sont traitées soit par voie aérobie (Malladi et Ingham, 1993; Rajasimman et Karthikeyan, 2007), soit par voie anaérobie (Annachhatre et Amatya, 2000; Rajbhandari et Annachhatre, 2004, Colin *et al.*, 2007), ou encore par la biotechnologie verte. Dans cette dernière approche, les éléments nutritifs présents dans les EUA sont recyclés par voie biotechnologique en produits à haute valeur ajoutée tels que la biomasse microbienne et enzymatique (Jin *et al.*, 1999, 2002), des agents de lutte biologique (Verma *et al.*, 2006) et des biopesticides (Brar *et al.*, 2005, Yezza *et al.*, 2006). Ainsi, l'utilisation des EUA, comme matières premières pour la production de biopesticides à base de Btk HD-1 (Brar *et al.*, 2005, Yezza *et al.*, 2006) démontre des avantages par rapport à celle des boues : (1) les EUA peuvent être employées directement sans prétraitement et l'entomotoxicité obtenue est souvent plus élevée que celle constatée avec les boues d'épuration (Yezza *et al.*, 2006); (2) le bouillon fermenté présente plusieurs avantages lors de la production du biopesticide (Brar *et al.*, 2005).

Suivant la fermentation, il est facile à manipuler et permet de produire le biopesticide Btk sans traitement particulier. La présence d'amidon dans le biopesticide offre une bonne adhérence sur les feuilles et une protection efficace contre les rayons ultraviolets (UV) sur le terrain. De plus, les performances atteintes en bioréacteurs de 15L et 150L constituent une confirmation des paramètres optimums pour la croissance de la souche Btk. Pour une production à plus grand volume, dans un réacteur pilote de 2000L, les performances obtenues en 15L et 150L doivent être optimisées. Cependant, la mise à l'échelle constitue un défi, vu le volume élevé à fermenter. Il est bien connu qu'à grande échelle, les micro-organismes sont plus exposés au changement des paramètres de production que sont le pH, la température, l'oxygène dissous et le milieu de culture (composition et approvisionnement). Ces variables présentent un effet substantiel sur la croissance cellulaire et la production de métabolites (Humphrey, 1998). D'autres paramètres d'ordre opérationnel tels que la qualité du mélange, l'âge de l'inoculum, la formation de la mousse, le transfert d'oxygène, l'agitation et le temps de stérilisation influencent aussi la croissance des bactéries dans le bioréacteur. Durant le passage à grande échelle, l'augmentation du volume et le transfert d'oxygène peuvent être des facteurs limitant au cours du procédé. Humphrey (1998) et Flores *et al.* (1997) ont

montré que le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) est un outil pratique pour la mise à l'échelle.

L'objectif de cette étude est d'optimiser la reproductibilité par le biais d'une fermentation comparative en bioréacteurs de 15L, 150L et 2000L pour la production du biopesticide Btk en utilisant les eaux usées de l'industrie d'amidon comme substrat nutritif.

Ce travail consiste, dans un premier temps, à produire de la biomasse de Btk dans des fermenteurs de 15L, 150L et 2000L en utilisant deux milieux (40% de bouillon fermenté concentré des EUA) comme substrats nutritifs. Ensuite, il s'agira de faire une étude comparative des résultats, afin de s'assurer de la reproductibilité du  $K_{La}$ , de l'OUR, de l'OTR, des cellules, des spores et de l'entomotoxicité obtenus en fermenteurs de 15L, 150L et en fermenteur de 2000L. La troisième expérience consiste à évaluer les problèmes rencontrés sur les bioréacteurs de 15L, de 150L et de 2000L durant la fermentation, afin d'apporter une solution pour une production uniforme sans contamination.

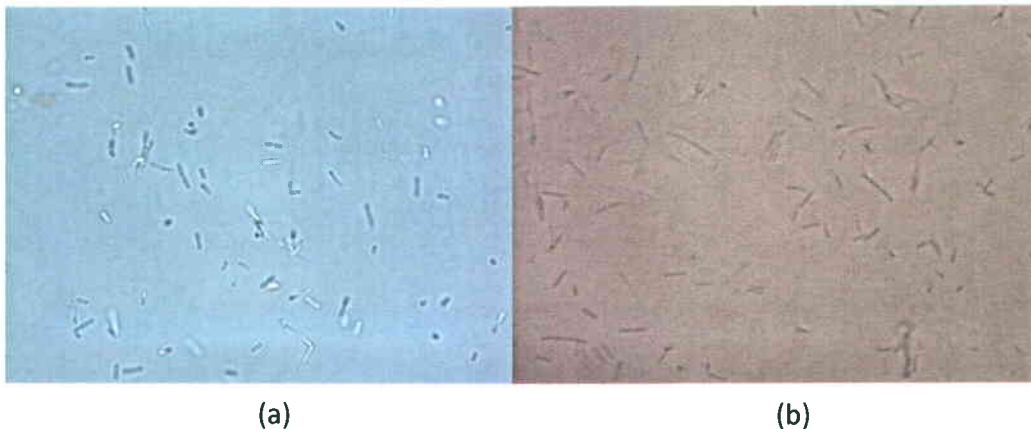
Les résultats de ce travail sont une base pour la production d'une formulation de Btk à grande échelle. Celle-ci permettra de tester son efficacité sur le terrain ; étape nécessaire à d'éventuels tests d'homologation pour protéger les forêts d'épinette blanche contre les larves de TBE (*Lepidoptera : (chroristoreuna fumiferana)*). Ces dernières opérations seront à a base de l'obtention d'un produit libellé et industriel à grande échelle.

La méthodologie adoptée pour atteindre ces objectifs, consiste à rapporter, à travers une synthèse bibliographique, les définitions et le contexte des points clé du travail proposé. Par la suite, il s'agira de déterminer la problématique et les objectifs de cette étude. De même, il faudra recenser le matériel et les méthodes utilisés pour atteindre les objectifs fixés. Ainsi, les résultats obtenus feront l'objet d'analyses et de discussions. En conclusion, il s'agira de faire le bilan de tout le travail élaboré durant cette étude de recherche. Cette partie est suivie des recommandations qui proposent de nouvelles orientations d'études pour les essais futurs.

# 1. REVUE DE LITTÉRATURE

## 1.1 *Bacillus thuringiensis*

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



**Figure 1 : Colonie de *Bacillus thuringiensis* à 18h de fermentation (a) et à 48h de fermentation (b)**

La souche HD-1 de Bt var. kurstaki (Btk HD-1) est l'une des souches les plus efficaces et les plus utilisées dans des formulations de biopesticides commerciales (Figure 1), car elle a un spectre d'activité assez étroit contre certains insectes ravageurs (Dulmage, 1970; Höfte et Whiteley, 1989). Le Tableau 1 présente quelques caractéristiques de Bt.

**Tableau 1 : Classification actuelle de 67 *Bacillus thuringiensis* sous-espèces en fonction de leurs flagelles (H) antigènes.**

| <b>Antigènes Flagellaire</b> | <b><i>B. thuringiensis</i><br/>Sous-espèces</b> | <b>Antigènes Flagellaire</b> | <b><i>B. thuringiensis</i><br/>Sous-espèces</b> |
|------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>1</b>                     | <b><i>Thuringiensis</i></b>                     | <b>28a, 28c</b>              | <b><i>Jegathesan</i></b>                        |
| <b>2</b>                     | <b><i>Finitimus</i></b>                         | <b>29</b>                    | <b><i>Amagiensis</i></b>                        |
| <b>3a, 3c</b>                | <b><i>Alesti</i></b>                            | <b>30</b>                    | <b><i>Medellin</i></b>                          |
| <b>3a, 3b, 3c</b>            | <b><i>Kurstaki</i></b>                          | <b>31</b>                    | <b><i>Toguchini</i></b>                         |
| <b>3a, 3d</b>                | <b><i>Sumiyoshiensis</i></b>                    | <b>32</b>                    | <b><i>Cameroun</i></b>                          |
| <b>3a, 3d, 3e</b>            | <b><i>Fukuokaensis</i></b>                      | <b>33</b>                    | <b><i>Leesis</i></b>                            |
| <b>4a, 4b</b>                | <b><i>Sotto</i></b>                             | <b>34</b>                    | <b><i>Konkukian</i></b>                         |
| <b>4a, 4c</b>                | <b><i>Kenya</i></b>                             | <b>35</b>                    | <b><i>Seoulensis</i></b>                        |
| <b>5a, 5c</b>                | <b><i>Galleriae</i></b>                         | <b>36</b>                    | <b><i>Malaysiensis</i></b>                      |
| <b>5a, 5c</b>                | <b><i>Canadensis</i></b>                        | <b>37</b>                    | <b><i>Anadalousiensis</i></b>                   |
| <b>6</b>                     | <b><i>Entomocidus</i></b>                       | <b>38</b>                    | <b><i>Oswaldocruzi</i></b>                      |
| <b>7</b>                     | <b><i>Aizawai</i></b>                           | <b>39</b>                    | <b><i>Brasiliensis</i></b>                      |
| <b>8a, 8b</b>                | <b><i>Morrisoni</i></b>                         | <b>40</b>                    | <b><i>Huazhongensis</i></b>                     |
| <b>8a, 8c</b>                | <b><i>Ostriniae</i></b>                         | <b>41</b>                    | <b><i>Sooncheon</i></b>                         |

### **1.1.1 Distribution de Bt**

Bt est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans le sol (Vilas-Boas et Franco Lemos, 2004), dans le phylloplane des plantes, dans les feuilles (Smith et Couche 1991), chez des insectes et dans les grains entreposés. Au cours des dernières années, Bt a été retrouvée dans des eaux douces (Ichimatsu *et al.*, 2000) et dans des boues

activées (Mohammedi *et al.*, 2006). Lee *et al.* (2002) ont signalé la présence de Bt dans des excréments d'animaux.

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

### **1.1.2 Formation des spores (sporulation)**

Bt se cultive facilement sur milieu artificiel. Par exemple, un milieu synthétique a été développé pour la culture d'une grande variété de souches de Bt (Nickerson et Bulla, 1974). En milieu liquide, lorsque la population cellulaire a atteint un maximum, les cellules végétatives sporulent. Du point de vue biochimique, la sporulation extensive peut être initiée, par la privation de nutriments essentiels, tels que le glucose, l'ammoniaque, le phosphate ou autre (Tzeng et Liu, 2000). La formation d'une endospore (l'état de dormance de Bt) est un processus de division cellulaire qui inclut la formation de protoplastes, dans le cytoplasme de la cellule (Bulla *et al.*, 1975). La séquence du développement des spores et de la formation des cristaux parasporaux chez Bt est résumée selon les étapes classiques de la sporulation : la phase I (7 h), la formation de filament axial dans lequel il n'y a pas d'implication apparente des mésosomes avec le nucléole; la phase II (7 à 8 h), formation de septum d'avant-spore impliquant les mésosomes; la phase III (8 à 9 h), la formation d'engouffrement avec la participation des mésosomes, première apparition d'inclusions ovoïdes et de cristaux parasporaux, changement dans la capacité de la teinte des membranes et du cytoplasme et formation de la pré-spore; les phases IV à VI (9 à 12 h), formation de l'exosporium, paroi cellulaire primordiale, cortex et manteaux de spore accompagnée par la transformation de la nucléoïde de spores ; la phase VII (après 12 h), maturation des spores (Bechtel et Bulla, 1976). Notons que les spores à maturité ou les spores après la lyse cellulaire (phase VII) ont plusieurs couches distinctes. À partir de la membrane intérieure, elles sont situées comme suit : paroi cellulaire primordiale, cortex, membrane externe, cytoplasme de la cellule mère incorporée, couche de spore lamellaire, couche externe fibreuse de spores et l'exosporium.

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

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

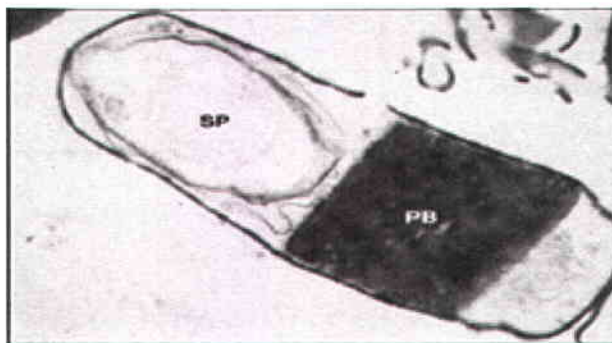
### **1.1.4 Synthèse des delta-endotoxines (protéines Cry) actives contre les lépidoptères**

#### **a. Gènes codants pour des protéines Cry**

Les gènes codants des protéines Cry ont été nommés gènes cry et leurs emplacements de synthèse situés sur des plasmides de Bt (Whiteley et Schnepf, 1986; Aronson *et al.*, 1986). En 1989, Höfte et Whiteley ont examiné les gènes cry connus et ont en proposé une nomenclature systématique (Höfte et Whiteley, 1989). Depuis, le nombre de séquences des gènes (codants pour les protéines Cry et Cyt) est passé de 14 à plus de 250. Toutefois, les gènes cry les plus connus (codants pour des protéines Cry) sont cry1 (action spécifique contre les lépidoptères), cry2 (action spécifique contre les lépidoptères et les diptères), cry3 (action spécifique contre les coléoptères), cry4 (action



spécifique contre les diptères) (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998). De nombreuses recherches ont aussi porté sur le clonage des gènes cry1, sur les mécanismes d'action et sur l'expression de ces gènes chez les plantes (Höfte et Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998). Certaines souches de Bt ne produisent qu'un seul type de protéines Cry. Par exemple, Bt var. kurstaki HD-73 ne produit que Cry1Ac. De nombreuses souches de Bt produisent plus d'un type de protéines Cry, chacune ayant sa propre spécificité insecticide comme par exemple, la souche HD-1 de Bt var. kurstaki qui contient des gènes codants pour différentes protéines Cry : Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac (spécifique à aux lépidoptères) et Cry2Aa (spécifiques aux lépidoptères et aux diptères) et Cry2Ab (spécifique aux lépidoptères) (Widner et Whiteley, 1989; Höfte et Whiteley, 1989). En fait, il est difficile de prédire l'activité biopesticide des souches de Bt en se basant seulement sur les gènes cry ou les produits de PCR de souches de Bt (Porcar et Juárez-Pérez, 2003). Par exemple, bien que les protéines de type Cry1A ont 90% de séquences identiques en acides aminés, différentes spécificités d'insecticide ont été signalées contre divers lépidoptères (Tableau 2) (Höfte et Whiteley, 1989).



**Figure 2 : Microscopie électronique de *Bacillus thuringiensis* au cours de la sporulation. L'inclusion parasporale noire est le cristal insecticide (<http://www.ufgrs.br/laprottox/digestion-eng.htm>).**

Les inclusions parasporales sont développées au cours des phases III à VI (8 à 12 h) de la sporulation. Le cristal parasporal de Bt a été observé durant l'engouffrement (phase III, 8 h) et possède un aspect cristallin à cette étape du développement. Le cristal atteint presque sa pleine grandeur au moment où l'exosporium apparaît (étape IV, 9 h). Un ovoïde pourrait être développé en même temps que l'apparence du cristal, Toutefois, certaines cellules ne produisent pas cette inclusion. L'inclusion ovoïde est facilement



distinguable du cristal parasporal (forme de diamant) parce qu'elle n'est pas cristalline et apparaît toujours ovoïde (Figure 2).

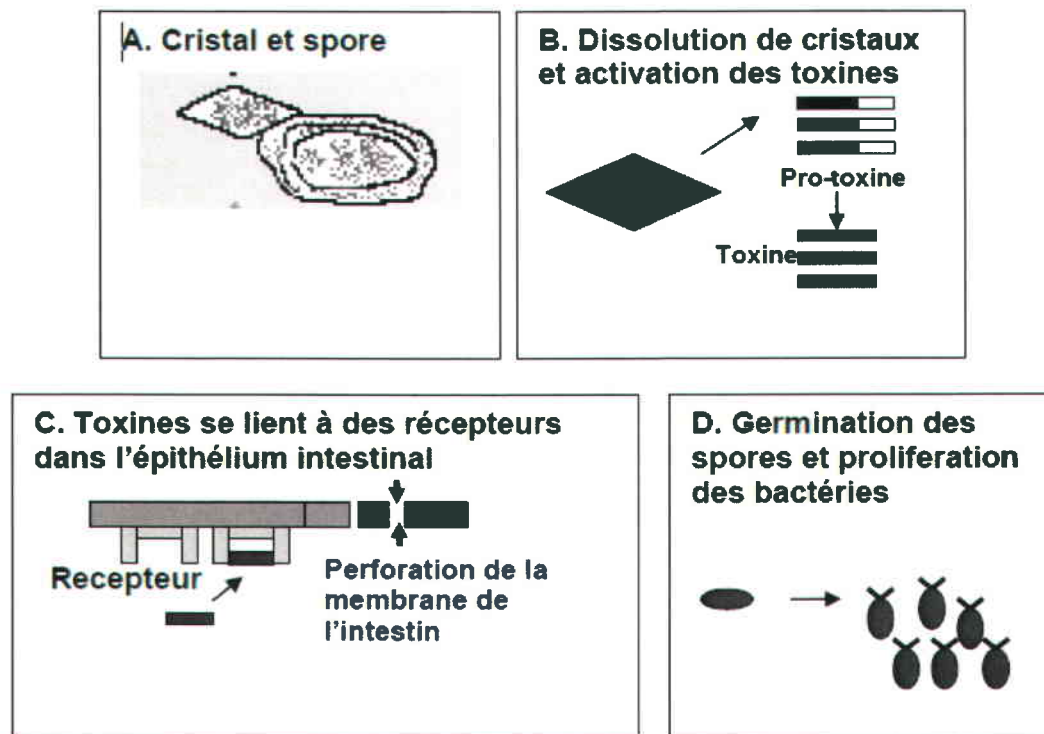
Plusieurs cristaux peuvent être synthétisés au sein d'une cellule, mais une seule inclusion ovoïde par sporange a été observée. Par ailleurs, le cristal parasporal et l'inclusion ovoïde ne sont pas toujours associés à une structure spécifique. Des sections sérielles révèlent que le cristal n'est pas connecté aux mésosomes où à des membranes provenant de la forespore ou de l'exosporium (Bechtel et Bulla, 1976).

### **b. Mode d'action de la toxine Cry1A contre les lépidoptères**

En général, les toxines Cry qui constituent les inclusions cristallines sont suffisamment létales pour tuer les larves d'insectes infectées. Lorsqu'ils sont ingérés par les larves d'insectes sensibles, ces cristaux de protéines sont dissous et activés dans le tube digestif des insectes. Ils se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules épithéliales de l'intestin moyen, provoquant des pores transmembranaires et causant la lyse cellulaire. Cette toxémie peut entraîner, par elle-même, la mort des larves d'insectes (Grochulski *et al.*, 1995; Agaisse *et al.*, 1999). Le mécanisme d'action des protéines Cry de Bt est présenté dans la Figure 3.

En particulier, les toxines Cry1A produites comme inclusions cristallines doivent être ingérées par les larves sensibles pour y être toxiques. Ces cristaux sont dissous dans le milieu alcalin et réductif de l'intestin moyen des larves, ce qui libère des pro-toxines solubles de 130 kDa et les pro-toxines inactives solubilisées sont clivées par des protéases de l'intestin moyen en fragments de 60-70 kDa contenant des protéines résistantes aux protéases (Bravo *et al.*, 2007). L'activation de la toxine implique l'élimination protéolytique d'un peptide N terminal (25-30 acides aminés pour Cry1 toxines, 58 résidus pour Cry3A et 49 résidus pour Cry2Aa) et environ la moitié des protéines reste à partir du C-terminal dans le cas des longues pro-toxines Cry. La toxine activée se lie à des récepteurs spécifiques sur la membrane de la bordure en brosse des cellules cylindriques de l'épithélium de l'intestin moyen (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007) avant de s'insérer dans la membrane. L'insertion de la toxine entraîne la formation de pores lytiques dans les microvillosités des membranes apicales (Aronson et Shai, 2001; Bravo *et al.*, 2007). Ultérieurement, la lyse cellulaire et la perturbation de l'épithélium de l'intestin moyen libèrent les composantes cellulaires

permettant la germination des spores qui provoque une septicémie sévère et la mort des insectes (de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, .2007).



**Figure 3 : Mécanisme de la toxicité des protéines Cry de Bt (modifié à partir de Whalon et Wingerd, 2003).**

- A :** L'ingestion de spores ou de protéines recombinantes par des larves phytophages.
- B :** Dans l'intestin moyen, les endotoxines sont solubilisées à partir des inclusions de protéines cristallisées. Pro-toxine Cry sont traitées protéolytiquement en toxines actives dans l'intestin moyen.
- C :** Toxine active se lie à des récepteurs sur la surface des cellules épithéliales cylindriques pour former des pores dans la membrane.
- D :** Lourds dommages à la membrane de l'intestin moyen conduisant à la famine ou à la septicémie.

### 1.1.5 Protéines insecticides végétatives (VIPs)

Il a été observé que certaines souches de Bt produisent des protéines insecticides végétatives (VIPs). Ces VIPs présentes dans le surnageant de culture pendant la croissance végétative de certains Bt sont des protéines insecticides qui ne présentent aucune homologie avec des cristaux protéines insecticides (Estruch *et al.*, 1996). Ces protéines comprennent les toxines binaires Vip1/Vip2, qui sont toxiques pour les coléoptères, et Vip3, qui est toxique pour les lépidoptères (Estruch *et al.*, 1996). Il a été démontré que Vip3A est toxique contre un large spectre d'insectes lépidoptères dont *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Chilo partellus*, *Helicoverpa punctigera* et *Diatraea saccharalis* (Estruch *et al.*, 1996; Donovan *et al.*, 2001; Selvapandiyani *et al.*, 2001; Loguercio *et al.*, 2002). Des différences ont été trouvées dans le mode d'action de Vip3A par rapport à l'effet des protéines Cry. L'apparition de symptômes provoqués par l'ingestion de Vip3A survient 36-48 h plus tard par rapport à celui de la delta-endotoxine (Yu *et al.*, 1997). En outre, le Vip3A se lie sur des récepteurs différents sur la bordure en brosse des vésicules membranaires (BBMV). En comparaison avec Cry1A protéines (Lee *et al.*, 2003), les VIPs peuvent être utilisés séparément comme biopesticides (Estruch *et al.*, 1996).

### 1.1.6 Chitinases

Depuis longtemps, les chitinases, enzymes hydrolysant la chitine (un homopolymère de  $\beta$ -1,4-N-acétyl-alignés glucosamine) ont été utilisées comme agent de synergie pour accroître l'entomotoxicité de biopesticides (Smirnov et Valéro, 1972). Il a été suggéré que la chitinase pourrait accroître la toxicité du Bt par perforation de la barrière de la membrane péritrophique de l'intestin moyen des larves et donc d'accroître l'accessibilité de la delta-endotoxine de Bt aux récepteurs sur les membranes des cellules épithéliales (Regev *et al.*, 1996). La perforation de la membrane péritrophique par la chitinase a été clairement démontrée par l'examen "in vivo" et "in vitro" par les études de Wiwat *et al.* (2000) et Thamthiankul *et al.* (2004). Ces résultats confirment le rôle essentiel de la chitinase dans l'hydrolyse de la membrane péritrophique, permettant ainsi la pénétration des spores et des cristaux de Bt dans l'hémolymphe des larves. Au cours des dernières années, il y a eu quelques recherches sur : (1) la sélection de souches de Bt qui peuvent produire des chitinases (Rojas-Avelizapa *et al.*, 1999; Barboza-Corona *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002); (2) le clonage et l'expression de gènes

codants pour la chitinase (provenant d'autres microbes) en Bt pour l'accroissement de l'entomotoxicité (Wiwat *et al.*, 1996; Tantimavanich *et al.*, 1997; Lertcanawanichakul et Wiwat, 2000; Sirichotpakorn *et al.*, 2001; Tantimavanich *et al.*, 2004; Thamthiankul *et al.*, 2004); (3) la production des chitinases endogènes ainsi que le clonage, le séquençage des gènes codants pour la chitinase ou les caractéristiques de certaines souches de Bt, tels que Bt var. kurstaki (Wiwat *et al.*, 2000), Bt var. parkitani (Thamthiankul *et al.*, 2001), Bt var. kenya (Barboza-Corona *et al.*, 2003), Bt var. israelensis (Zhong *et al.*, 2003), Bt var. alesti (Lin et Xiong, 2004), Bt var. sotto (Zhong *et al.*, 2005). Toutefois, ces recherches ont été le plus souvent utilisées en fermentation en milieu synthétique complétée par de la chitine colloïdale pour la production de chitinase et de biopesticides à base de Bt sauf pour les recherches de Rojas-Avelizapa *et al.* (1999) qui ont été appliquées pour la fermentation à l'aide de déchets (déchets blanchis de crevettes) comme seul ingrédient pour la production de chitinases et de biopesticides de Bt.

#### **1.1.7 Protéases de Bt**

Pendant la croissance, Bt peut produire certains types de protéase nécessaires pour hydrolyser des protéines dans les milieux synthétiques ou complexes. Ainsi, une métalloprotéase (37,5 kDa; pH optimal de 6,5-7,5) a été produite par Bt var. kurstaki HD-1 (Btk HD-1) dans le milieu synthétiques (Li et Yousten, 1975); quatre protéases ont été fractionnées et caractérisées dans le milieu du bouillon de fermentation (Zouari et Jaoua, 1999); une protéase sérine thermostable (34 kDa, ayant une activité maximale à 70°C et à un pH de 8,5-9,0) produites par Bt var. kurstaki HD-255 en milieu synthétique (Kunitate *et al.*, 1989); deux des protéases neutres et alcalines ont été produites au cours de la croissance de Btk HD-1 par croissance dans les boues d'épuration (Tyagi *et al.*, 2002), etc. En outre, il a été constaté que certaines protéases alcalines sont associées à des cristaux protéines insecticides (Bulla *et al.*, 1977; Chestukhina *et al.*, 1980; Nickerson *et al.*, 1981; Bulla *et al.*, 1981).

Jusqu'à présent, le rôle de la protéase dans l'accroissement ou la diminution de l'activité insecticide des delta-endotoxines contre les insectes nuisibles n'a pas été confirmé. Il convient de mentionner à nouveau que, après ingestion par des insectes sensibles, les cristaux sont solubilisés par le milieu alcalin de l'intestin des insectes et les cristaux protéiques solubilisés (les pro-toxines pleine longueur et inactifs) sont transformés en

fragments plus petits et entomotoxiques. Deux sources d'activités protéolytiques sont capables de traiter et/ou de dégrader les cristaux protoxines :

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

(b) au cours de la sporulation, Bt synthétise des enzymes protéolytiques (Brar *et al.*, 2007), et cette activité protéolytique peut traiter et/ou dégrader les cristaux protéiques ( Chestukhina *et al.*, 1980; Nickerson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1989; Kunitate *et al.*, 1989; Donovan *et al.*, 1997; Tan et Donovan, 2000).

En fait, ils peuvent dégrader les protéines insecticides. Toutefois, leur absence ou leur présence ne modifient pas l'activité biopesticide des cristaux protéiques de Bt qui sont spécifiquement entomopathogéniques contre les lépidoptères (Nickerson *et al.*, 1981; Donovan *et al.*, 1997; Tan et Donovan, 2000 ). Toutefois, dans certains cas, l'inhibition de la protéase alcaline pourrait augmenter l'activité insecticide de Bt (MacIntosh *et al.*, 1990). Ainsi, le rôle de ces protéases dans l'activité insecticide doit être vérifié (Brar *et al.*, 2007).

### **1.1.8 Inhibiteurs immunitaires contre Bt**

Bt est très résistant face au système humoral de défense de l'hôte, en particulier contre les cécropines et les attacines, qui sont les principales classes de peptides antibactériens inductibles chez divers lépidoptères et diptères (Edlund *et al.*, 1976; Dalhammar et Steiner, 1984;; Fedhila *et al.*, 2002). Une métalloprotéase contenant du zinc sécrétée par Bt, appelée Inha ou InA, en particulier hydrolyse les cécropines et les attacines dans l'hémolymphe de *Hyalophora cecropia* in vitro (Edlund *et al.*, 1976; Dalhammar et Steiner, 1984;). Bien que la dégradation des cécropines et des attacines par Inha puisse expliquer en partie le succès de Bt pour envahir l'hémolymphe, l'importance de cette protéase dans la virulence a été débattue (Siden *et al.*, 1979; Dalhammar et Steiner, 1984; Lövgren *et al.*, 1990;). En effet, le rôle de l'Inha dans la résistance au système immunitaire humoral n'est pas compatible avec la durée de sa production. L'expression tardive de l'Inha n'est pas compatible avec la production de l'antipeptide, qui est une première réaction de défense de l'hôte (Fedhila *et al.*, 2002). Un autre rôle putatif est suggéré par le fait que l'Inha purifiée a un effet létal après

injection chez l'insecte hôte. Les symptômes associés à l'administration de l'Inha sont typiques de la toxémie et non d'une septicémie bactérienne (Siden *et al.*, 1979; Lövgren *et al.*, 1990;). Ainsi, les rôles de ces inhibiteurs immunitaire comme un agent possible de synergie (ou non) ne sont pas encore bien définis.

#### **1.1.9 Beta-exotoxine ( $\beta$ -exotoxine)**

La bêta-exotoxine, également connue sous le nom de thuringiensine (C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P<sub>1</sub>.3H<sub>2</sub>O), est un composé non-spécifique et stable à la chaleur. Elle est sécrétée dans le milieu de culture au début de la sporulation par certaines souches de Bt. Ceci est un analogue insecticide de l'adénine-nucléotide, composé de l'adénosine, du glucose et de l'acide allorique et son poids moléculaire est de 701 Da (Bond *et al.*, 1969). La toxicité de la  $\beta$ -exotoxine résulte probablement de l'inhibition de l'ARN polymérase et qui par concurrence avec l'ATP, inhibe la synthèse de l'ARN (Campbell *et al.*, 1987). Sa toxicité sur la mue et la nymphose et à doses sublétales, ses effets tératologiques sur les différents ordres d'insectes a été décrite. En raison de sa toxicité pour les vertébrés, la plupart des préparations commerciales de Bt sont préparées à partir d'isolats qui ne produisent pas de  $\beta$ -exotoxine (Espinasse *et al.*, 2003).

#### **1.1.10 Zwittermicine A**

Zwittermicine A est un antibiotique aminopolyol fongistatique de 396 Da qui est produit par de nombreux bacilles, y compris les souches de Bt. Elle est produite au cours de la sporulation de Bt (Silo-Suh *et al.*, 1998; Stabb *et al.*, 1994; Stohl *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2004; Manker, 2002). La Zwittermicine A obtenue à partir de *Bacillus cereus* peut augmenter l'activité insecticide de Bt subsp. *kurstaki*, alors que seule, elle ne montre aucune activité insecticide lors d'un essai contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) (Broderick *et al.*, 2000, 2003). Il existe plusieurs mécanismes possibles par lesquels Zwittermicine A pourrait renforcer l'activité de Bt contre la spongieuse tels que : (1) l'action directe contre les cellules d'insectes, une fois qu'elles deviennent accessibles par le biais de la perforation de l'intestin moyen de l'épithélium de Bt; (2) l'action directe sur divers aspects de la fonction de l'intestin moyen, telles que la rupture de la membrane péritrophique ce qui supprime une barrière physique, la stimulation des protéases nécessaires pour solubiliser et activer des delta-endotoxines de Bt et la

modification des propriétés de l'intestin moyen de l'épithélium pour faciliter la liaison des toxines de Bt et la formation de pores; (3) les propriétés antimicrobiennes de Zwittermicine A peuvent modifier la composition de la microflore intestinale dans la spongieuse. La microflore intestinale est essentielle pour de nombreux insectes pour leur croissance normale, le développement, la reproduction, la digestion et la nutrition. La perturbation de ces relations peut potentiellement modifier l'efficacité de Bt (Broderick *et al.*, 2000).

## **1.2 Paramètres de fermentation**

La composition du milieu de culture, les paramètres et les conditions de fermentation semblent affecter la croissance, la sporulation, la synthèse des cristaux et la synthèse des endotoxines. Les revues de littérature de Sachdeva *et al.* (1999), Bernhard et Utz (1993) et Foda *et al.* (1985) constituent d'excellentes références exposant l'ensemble de ces facteurs.

### **1.2.1 La composition du milieu de culture**

Le pouvoir insecticide de Bt dépend de l'activité intrinsèque de la bactérie (diversité des toxines) ainsi que de la composition du substrat de fermentation (Khuzamshukurove *et al.*, 2001) et l'approvisionnement en milieu de culture durant la fermentation. Perani et Bishop (2000) ont observé que la composition du milieu de culture affecte la concentration des delta-endotoxines, la taille et la forme du cristal et par conséquent le potentiel entomotoxique. L'optimisation du milieu de culture est associée à un large nombre de paramètres physiologiques et nutritionnels, entre autres, la concentration en azote et carbone (le rapport C/N), sans négliger les minéraux. Plusieurs chercheurs ont montré que le processus de formation des spores et de synthèses des cristaux dépend du rapport azote/carbone.

À travers la relation étroite entre la formation du cristal et la sporulation, la régulation par les sources de carbone peut être considérée comme un contrôle direct de la formation de l'inclusion parasporale, ou encore un effet indirect résultant de la stimulation ou de la suppression de la sporulation (Rowe et Margaritis, 1987; Liu et Bajpai, 1994; Zouari *et al.*, 1998; İçgen *et al.*, 2002b;). Généralement, l'absence de source de carbone inhibe la sporulation (Nickerson et Bulla, 1974). Un changement de la source de carbone

provoque des variations au niveau de la croissance de Bt et de la taille du cristal (Farrera *et al.*, 1998). L'azote semble être le facteur le plus déterminant lors de la multiplication cellulaire et de la sporulation puisqu'il intervient dans la synthèse des protéines cellulaires, des enveloppes des spores et dans la synthèse des acides nucléiques. Les sources d'azote exercent un contrôle direct sur la formation du cristal par stimulation de la production des endotoxines (Pearson et Ward, 1988; Zouarie *et al.*, 1998; Içgen *et al.*, 2002b). Yang et Wang (2000) ont conclu que l'épuisement des sources d'azote organique et inorganique dans le milieu de culture, au début de la synthèse des protéines toxiques, déclenche la sporulation et la synthèse des cristaux.

### **1.2.2 Température et pH de fermentation**

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

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

### **1.2.3 Optimisation de l'inoculum**

La durée de la phase exponentielle dépend de la disponibilité, de la nature des nutriments présents dans le milieu de culture et, surtout, de l'âge et de la physiologie de l'inoculum (Barnabé, 2000). Un inoculum de bonne qualité garantit une phase de latence plus courte, une meilleure croissance et une réduction du temps de culture. Les variables qui affectent l'inoculum se résument à sa préparation, son volume et son âge.

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

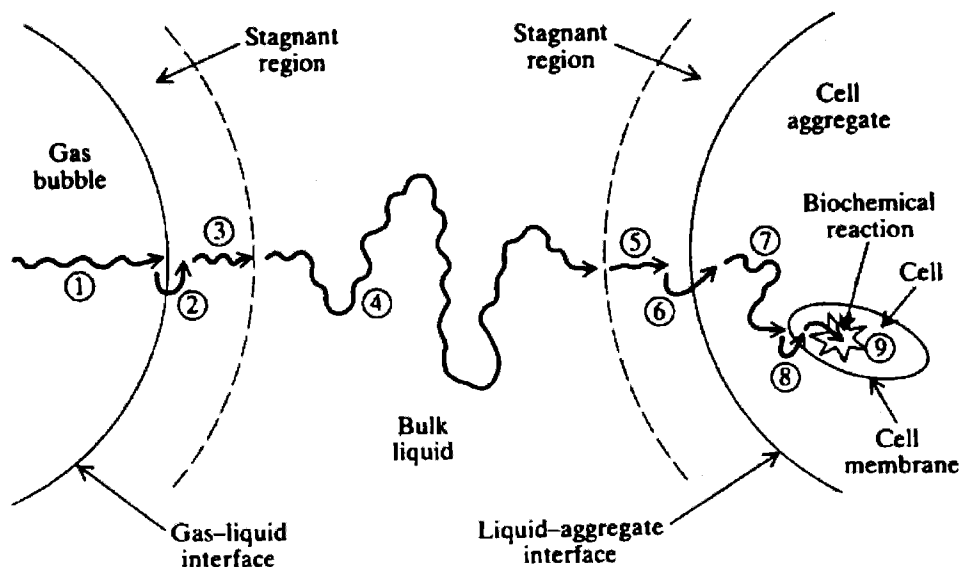


L'utilisation d'un volume d'inoculum relativement faible (1%) ou encore de plus grands volumes (4-5%) provoque une diminution du potentiel entomotoxique (Lachhab *et al.*, 2001). Une forte concentration cellulaire initiale pourrait induire une consommation rapide de l'oxygène et des autres nutriments. Par conséquent, une limitation de ces éléments devrait amener de faibles taux de croissance. Un volume optimum d'inoculum de 2% a été retenu parce qu'il assure une meilleure concentration cellulaire sans entraver la concentration d'oxygène dissoute.

L'âge de l'inoculum joue un rôle important dans le temps d'induction de la sporulation. Il est préférable d'inoculer le milieu avec une culture active en phase de croissance exponentielle, 7 heures après inoculation (Vidyarthi *et al.*, 2001). Les cellules en division sont plus énergiques (mobiles) et leur métabolisme de synthèse d'enzymes inductibles est plus actif.

#### **1.2.4 Transfert d'oxygène**

Le transfert d'oxygène jusqu'au sein du milieu de culture constitue un problème critique. Il a été démontré lors du transfert d'oxygène depuis la bulle d'air jusqu'aux systèmes enzymatiques internes de la cellule microbienne (Figure 4). Le passage de l'oxygène au sein du liquide est l'étape qui offre la plus grande résistance (Arnold et Steel, 1958).



**Figure 4 : Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995).**

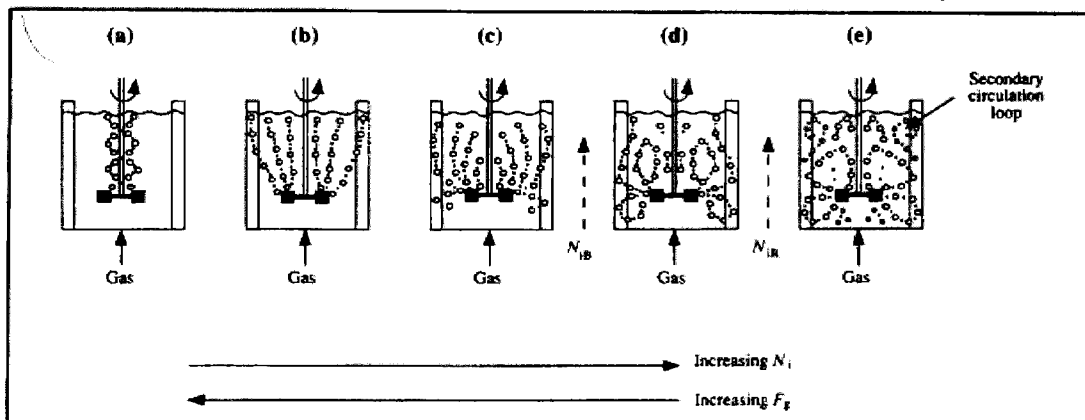
1. Transfert de l'O<sub>2</sub> depuis l'intérieur de la bulle vers l'interface gaz-liquide
2. Mouvement à travers l'interface gaz-liquide
3. Diffusion à travers la région stagnante ceinturant la bulle
4. Transport à travers le milieu de culture
5. Diffusion à travers la zone stagnante entourant la cellule
6. Mouvement à travers l'interface liquide + cellule
7. Transport à travers le cytoplasme vers les sites de réaction

### 1.2.5 Agitation du milieu

Les processus physiques qui déterminent la taille des bulles dans les fermenteurs sont l'aération et l'agitation. Ces processus ont une influence importante sur le taux de transfert d'oxygène. La couronne d'aspersion de l'air est normalement positionnée dans l'axe central des pâles. Ces dernières offrent une agitation mécanique et distribuent l'air sous forme de petites bulles dans le fermenteur. Lorsque l'oxygène est présent dans la surface agitée, il est aspiré dans les cavités à basse pression derrière les pâles de la turbine (Rushton et Oldshue, 1953). Ces cavités réduisent la résistance à l'écoulement du fluide et la diminution du coefficient de traînée de l'agitateur. Comme les aubes de la turbine tournent à grande vitesse, les petites bulles d'oxygène sont éjectées à l'arrière des cavités dans la masse liquide sous l'influence de la dispersion du processus. Une représentation schématique du débit d'air (aération) et de la vitesse de la turbine

(agitation) est représentée sur la Figure 5. Différentes configurations d'écoulement de l'oxygène se développent en fonction du taux relatif d'entrée de l'oxygène et de l'agitation. Si le niveau de vitesse d'agitation est faible et le taux d'alimentation en oxygène est élevé, le motif d'écoulement de gaz est dominé par des flux d'air le long de l'axe de l'agitateur comme le montre la Figure 5(a). Ce modèle d'écoulement est appelé « inondation de la pâle d'agitation » et représente une mauvaise dispersion du mélange de l'oxygène. Quand la vitesse de la turbine augmente, l'oxygène est capturé derrière les pâles de l'agitateur et est dispersé dans le liquide. La Figure 5(b) montre la vitesse d'agitation minimum nécessaire pour disperser complètement l'oxygène. Avec de nouvelles hausses des vitesses d'agitation, de petits motifs de recirculation commencent à émerger, comme indiqué dans les Figures 5(c) et 5(d). Le modèle de dispersion souhaitée est illustré par la Figure 5(e).

Les bouillons de fermentation varient dans leurs propriétés en fonction du produit désiré. Aussi, la viscosité du bouillon peut changer pendant la fermentation. De plus, augmenter, dans les conditions typiques de fonctionnement du fermenteur, la vitesse d'agitation; améliore le transfert d'oxygène. Ahmad *et al.* (1994) ont constaté que l'augmentation de transfert d'oxygène de 8,94 à 38,63 mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> est obtenue quand la vitesse d'agitation est élevée de 300 à 600 tours/min. L'augmentation de la vitesse d'agitation est la méthode traditionnelle utilisée pour améliorer le taux de transfert d'oxygène. Plus le produit est agité, plus la dispersion de l'oxygène est créée, et plus le gaz dispersé entraîne un meilleur transfert d'oxygène.



**Figure 5 : Distribution des bulles d'air en fonction de l'agitation et du flux d'air (Doran, 1995).**

La formation des spores et la synthèse de cristaux sont étroitement dépendantes de la disponibilité d'O<sub>2</sub> dans le milieu de culture (Avignone-Rossa *et al.*, 1992; Zouari *et al.*, 2002a). Ce transfert d'oxygène est fonction du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ). Ce dernier caractérise le transfert gaz-liquide, dont l'équation aux dimensions est exprimée en inverse du temps. C'est aussi l'un des facteurs les plus importants pour la mise à l'échelle du procédé. En pratique, la mesure de ce coefficient exprime la capacité d'oxygénation du milieu contenu dans le bioréacteur. Il est couramment utilisé pour mesurer le taux de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation d'oxygène (OUR). Les paramètres qui affectent le transfert d'oxygène dans un réacteur type « cuve agitée » et les performances du procédé de fermentation de Bt sont illustrés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée.**

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

## **1.3 Techniques de formulation**

### **1.3.1 Récolte - Centrifugation et autres**

Les bouillons fermentés comprennent des cristaux protéiques, des spores, des débris cellulaires et des particules solides résiduelles avec d'autres facteurs de virulence qui doivent être récoltés de façon économique pour l'étape subséquente de la formulation (Bernhard et Utz, 1993; Rowe et Margaritis, 2004). La plupart des produits commerciaux de Bt contiennent des cristaux protéiques insecticides (CPI) et des spores viables. Pendant la production à grande échelle de Btk, il pourrait y avoir une perte importante d'ingrédients bioactifs. Celle-ci est souvent due à la méthode de récolte utilisée. Au début, le procédé de lactose-acétone a été utilisé comme technique de laboratoire pour récolter des spores de Bt (Dulmage *et al.*, 1970; Dulmage et Rhodes, 1971). Cependant, l'utilisation des méthodes avancées telles que l'ultracentrifugation, la microfiltration et la filtration sous vide pour séparer les particules insolubles (ingrédients actifs) du liquide (fraction inerte) du bouillon fermenté, a donné des résultats probants lors de la récolte des composantes actives (des lipases et des protéines) (Gulati *et al.*, 2000; Boychyn *et al.*, 2000). Le séchage par pulvérisation a été communément utilisé pour produire des formulations à partir de grands volumes de bouillons fermentés. Le séchage peut être précédé d'une étape d'épaississement par centrifugation ou filtration du bouillon fermenté en présence d'additifs comme le celite (facilite l'épaississement) (Bonnefoi, 1963; Tamez-Guerra *et al.*, 1996). Une récolte efficace du complexe actif spore-cristal de Bt a été documentée en utilisant soit une centrifugeuse à disques empilés ou soit un appareil de filtration à vide avec une efficacité de récolte de spores de plus de 99% (Zamola *et al.*, 1981). La récolte des ingrédients actifs peut augmenter ou diminuer l'activité de l'insecticide. Les techniques courantes basées sur la centrifugation conventionnelle, différentielle gradient de densité et le séchage par pulvérisation peuvent entraîner des pertes lors de la récolte des delta-endotoxines. Ces méthodes pourraient être adaptées avec succès aux biopesticides à base de boues. Par exemple, il n'est peut-être pas nécessaire d'ajouter des additifs pour favoriser l'épaississement. En effet, les boues fermentées contiennent des floccs qui peuvent se comporter comme des adsorbants pour les spores et les cristaux protéiques pendant la centrifugation et peuvent également agir comme protecteurs pendant les conditions défavorables de séchage suite à la pulvérisation.

### 1.3.2 Formulations des biopesticides

Le développement de la formulation est un procédé important dont le succès dépend des facteurs suivants : 1) la stabilisation des ingrédients actifs pendant la distribution et le stockage; 2) la facilitation de la manipulation et de l'application du produit; 3) la protection contre des facteurs environnementaux défavorables; 4) l'amélioration de l'activité des ingrédients actifs sur le terrain. Principalement, une formulation comporte des ingrédients actifs (i.a.) (mycètes, bactéries, virus, nématodes) et des adjuvants/additifs (agents de suspension et de protection contre les UV, agents antimicrobiens, phagostimulants, adhésifs). Le critère de sélection des adjuvants/additifs est régi par le type de formulation désiré et s'applique à toutes les formulations des bouillons fermentés par Bt. Les formulations de Bt peuvent être globalement classées en deux groupes : les formulations solides (poussières, granules, poudres, briquettes) et les formulations liquides (suspensions ou émulsions) (Rhodes, 1993).

Les formulations solides, incluant les poussières et les poudres humides, comportent principalement des adhérents et des déshydratants et sont très utilisées pour le contrôle de la pyrale du maïs (Sundara-Babu *et al.*, 1970; McGaughey, 1985). Les granules sont faits à partir de la farine de blé, de la fécule de maïs, *de la gélatine et de plusieurs autres matériaux* (Tamez-Guerra *et al.*, 1996; Navon *et al.*, 1997; Maldonado *et al.*, 2002). Les briquettes sont un type de formulation flottante faites avec des matériaux comme la farine de blé et sont couramment utilisées pour les formulations de Bti (Mittal, 2003). Les suspensions liquides comportent les concentrés liquides qui ne sédimentent pas à cause de l'agglomération réversible par les agents de dispersion. Elles comportent aussi des agents tensio-actifs qui agissent comme des agents mouillants favorisant la pulvérisation. Les agents tensio-actifs de nature non ioniques (dérivés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène) sont généralement utilisés en combinaison avec des agents de protection contre les rayons UV hydrosolubles (Burges, 1998). Il y a également des émulsions huile/eau et eau/huile dont l'usage domestique ou agricole est restreint (Langley, 1998). D'ailleurs, les progrès dans les formulations de bio-insecticides garantissent une très bonne protection envers des conditions environnementales défavorables (rayons UV, pluie ...). La stabilité résiduelle améliorée permet une diffusion lente de la formulation dans le milieu. Les biopesticides comprennent des formulations encapsulées à base d'amidon et de lignine (Toreki *et al.*, 2004). Il existe également un

type de formulation permettant d'augmenter l'entomotoxicité par stimulation ou par synergie avec des phagostimulants (Broderick *et al.*, 2000).

Néanmoins, les formulations de Bt ont une faible persistance sur le terrain à cause des facteurs environnementaux défavorables (rayons UV, pH du feuillage, température, rosée, pluie) qui doivent être pris en compte pour développer de nouvelles formulations. La lumière naturelle du soleil, en particulier le rayonnement des spectres UV (UV-B, 280-310 nm et UV-A, 320-400 nm), est principalement responsable de l'inactivation des ingrédients actifs. Plusieurs études ont été effectuées avec l'incorporation de divers agents protecteurs contre les rayons UV tels le rouge Congo, l'acide folique, la mélasse, la lignine, l'alginate, la cellulose, l'acide p-amino benzoïque, et les résultats étaient plus ou moins intéressants (Salama *et al.*, 1993). Les précipitations représentent un autre facteur naturel important qui affecte l'efficacité des biopesticides en les enlevant du feuillage par lessivage avant leur interaction avec l'insecte cible. Les microencapsulations à base d'amidon et l'utilisation d'adhésifs naturels et synthétiques aident à atténuer le lessivage (Ferro *et al.*, 1997; Hatfaludi *et al.*, 2004). Des composés organiques volatils, comme les aldéhydes, les cétones, les acides carboxyliques et leurs dérivés présents sur le feuillage, auraient un effet antibiotique sur les spores de Bt et causent parfois leur inactivation ou retardent leur activité (Ferry *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la manière la plus efficace de contrer l'effet de pH sur les feuillages est de bien planifier la séance de pulvérisation et d'ajouter des tampons dans la formulation ou dans la cuve à mélanger. Les effets du pH sont souvent observés lorsque les mélanges à pulvériser sont entreposés dans des contenants en aluminium ou en fer qui sont sensibles à la corrosion et qui nécessitent l'utilisation de tampons. Des problèmes de corrosion peuvent affecter l'efficacité des biopesticides sur le terrain (Burgess, 1998). Il est aussi démontré que le pH affecte la performance de la formulation aussi bien pendant le stockage (action des protéases) que pendant l'application (corrosion des réservoirs) et après l'application. De plus, la température élevée de l'atmosphère, lors des applications, peut diminuer l'activité des produits à base de Bt, spécialement dans les régions tropicales où les températures excèdent fréquemment 30°C (Morris, 1983). Pour développer avec succès des biopesticides et maximiser leur efficacité sur le terrain, il faut tenir compte de facteurs biotiques (concentration des spores et l'entomotoxicité) et abiotiques (rayonnement UV, température, pH, pluie, feuillage, etc.). De plus, différents paramètres et additifs pour les différentes formulations doivent



également être considérés (par exemple, la formulation ne doit pas contenir de matériau hygroscopique pour éviter la formation d'agrégats dans les produits secs). La possibilité de contamination et la dégradation des cristaux protéiques pendant le stockage doivent aussi être réduites en diminuant le pH avec des solutions très acides. Quant aux différents types de formulations solides et liquides, ils ont plusieurs avantages et inconvénients, mais ils trouvent tous une place sur le marché et répondent très bien aux besoins des utilisateurs. En raison de l'obligation de minimiser les coûts de production, le procédé de fermentation du biopesticide doit être configuré de manière à satisfaire aux exigences de la formulation qui forment un pont entre la fermentation de Bt et l'application sur le terrain.

#### **1.4 Mise à l'échelle**

La mise à l'échelle correspond à l'augmentation du volume de fermentation. Ceci n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal. Il est bien connu qu'à grande échelle, les microorganismes sont plus exposés au changement des paramètres environnementaux, entre autres, le pH, la température, l'oxygène dissous et la composition du milieu de culture. Ces variables présentent un effet substantiel sur la croissance cellulaire et la production de métabolites (Humphrey, 1998; Hsu et Wq, 2002). D'autres paramètres d'ordre opérationnel s'y ajoutent tels que la qualité du mélange, la physiologie et l'âge de l'inoculum, l'approvisionnement en milieu de culture, la formation de la mousse et le temps de stérilisation. La mise à l'échelle s'effectue à plusieurs étapes de la fiole d'ermenmeyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel. Il est difficile de conserver l'ensemble des paramètres identiques ou proportionnels au changement d'échelle. Chaque transfert à une plus grande échelle est complexe car divers paramètres tels que le barème de stérilisation, l'aération et l'agitation sont modifiés lorsqu'on augmente le volume, le diamètre et la hauteur du bioréacteur. Des conditions physicochimiques similaires doivent être maintenues dans l'environnement de chaque cellule malgré l'augmentation du volume de culture. À chaque étape de la mise à l'échelle, divers paramètres sont analysés puis modifiés car les réactions physicochimiques et enzymatiques se produisant à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé. Il est à noter que lors de la culture de Bt, les forces de cisaillement ne sont pas critiques lors de la mise à échelle (Flores *et al.*,

1997). Un des aspects importants de celle-ci est le transfert d'oxygène dans le bioréacteur. Lors de l'augmentation de volume, la diffusion de l'oxygène peut être le facteur limitant du procédé. Flores *et al.* (1997) et Humphrey (1998) ont montré que le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) est un outil pratique pour la mise à l'échelle. Braun (2000) prévoit que les données récoltées à partir d'une fermentation en bioréacteur de 15 L peuvent être extrapolées avec succès en une culture de 30 m<sup>3</sup>. En effet, plusieurs travaux de recherches ont montré que pour les fermentations biologiques, la mise à l'échelle est supposée améliorer le rendement du système, (Flores *et al.*, 1997; Humphrey, 1998), durant le passage de la petite échelle (erlenmeyer, 15L) à la grande échelle (150L et 2000L).

### **1.5 Problématique**

La protection des forêts et des cultures contre les insectes ravageurs nuisibles (ex : la tordeuse des bourgeons de l'épinette - TBE) nécessite la production du biopesticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD (Btk), Bioval, en remplacement des pesticides chimiques qui sont néfastes pour l'environnement et la santé humaine. Ce biopesticide est produit à partir des eaux usées produites par l'industrie de l'amidon (EUA) comme substrat nutritif afin de réduire le coût élevé de production. Sa valorisation permet également de résoudre le problème de gestion et de disposition des EUA dans l'environnement.

La production du bouillon fermenté en bioréacteurs 15L, 150L et 2000L, en utilisant les EUA comme source de nutriments pour la croissance des bactéries Btk durant la fermentation, est ralentie par des contaminations microbiennes. Le mauvais design des équipements des bioréacteurs est, en partie, responsable de ce problème. Les paramètres de fermentation, de centrifugation et de formulation du biopesticide doivent être optimisés durant la mise à l'échelle. Ainsi, le biopesticide obtenu pourra satisfaire la qualité requise pour son épandage.

## **2. Objectif de recherche**

Cette étude de recherche consiste, à travers une mise à l'échelle, à maintenir, contrôler et améliorer les paramètres de production durant la fermentation en bioréacteurs de 15L, 150L et 2000L dans les EUA en vue de l'obtention d'un biopesticide ayant un

potentiel élevé, en terme de cellules, de spores et d'entomotoxicité efficace contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Ce travail a pour but primaire de produire des bouillons fermentés qui seront formulés afin d'avoir un biopesticide performant. Ce produit devra être de bonne qualité, c'est-à-dire avoir un pouvoir larvicide (entomotoxicité) élevé. Pour ce faire, différentes études seront réalisées afin d'obtenir des résultats probants qui permettront de livrer 1000L de formulation liquide obtenu après 10 séries de fermentation sans contamination à la SOPFIM. Ainsi, les objectifs à atteindre dans ce travail sont :

- Identification et résolution des différents problèmes rencontrés durant la mise à l'échelle du procédé de production, de l'étape de la fermentation à la formulation.
- Définition et élimination de tous les problèmes dus à l'équipement et au design des bioréacteurs qui affectent le procédé de fermentation.
- Optimisation et contrôle de l'impact des paramètres ( $K_{La}$ , oxygène dissous-DO, pH, et température) sur le déroulement de la fermentation.
- Évaluation de la présence des contaminants dans les bouillons fermentés (BF) à travers la culture des cellules, afin de juger de l'efficacité des équipements, du design des bioréacteurs et du rôle des paramètres choisis.
- Évaluation de la présence des contaminants dans le culot (où crème concentré) à travers la culture des cellules, afin de juger de l'efficacité de la centrifugeuse.
- Test sur la stabilité du bouillon fermenté et du culot conservé à 4°C à travers une étude de la viscosité, de la taille des particules, des solides totaux, des matières en suspension, du pH, des cellules, des spores, de l'entomotoxicité et des contaminants.

➤ **Reproductibilité des résultats obtenus en phase laboratoire vers la phase industrielle**

- Caractérisation et identification des eaux usées d'amidon (EUA), de la composition du milieu de fermentation de la bactérie Btk et de la composition du biopesticide, Bioval.
- Étude comparative des bioréacteurs utilisés (15L, 150L et 2000L) afin de ressortir les paramètres de mise à l'échelle.

- Caractérisation du bouillon fermenté, de la crème et du biopesticide Bioval obtenu suivant le processus de mise en échelle à travers les 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L).
  - Évaluation des paramètres de stabilité du bouillon fermenté, de la crème et du Bioval avant et après conservation à 4°C sur une période déterminée.
  - Identification des paramètres physiques durant la stabilité des échantillons : potentiel Zêta, viscosité, taille des particules, solide totaux, matières en suspension et pH.
  - Identification des paramètres de cultures des Btk et d'élevage de la TBE durant la stabilité : cellules, spores, delta-endotoxine et entomotoxicité.
- **Test de fiabilité et d'efficacité de l'inoculum durant la fermentation de l'ermenmeyer au bioréacteur de 15L**
  - **Étude statistique de tous les résultats obtenus selon le modèle déterminé par le logiciel STATISTICA ANOVA.**

## **2.1 Originalité de la recherche**

Cette étude permettra pour la première fois d'obtenir un biopesticide produit avec des eaux usées comme source de nutriments à travers un processus de mise à l'échelle à travers 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L). Ce travail permettra de savoir, à travers, une étude comparative, si le biopesticide Bioval produit à grande échelle sera aussi ou plus performant à petite échelle.

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **3.1 Souche *Bacillus thuringiensis***

La bactérie utilisée; *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Btk), est fournie par le laboratoire de Forêt Canada de Ste-Foy. Cette bactérie est cultivée sur une gélose tryptique soja (TSA) à 30°C/12h dans une étuve (Imperial II incubateur). La subculture est conservée à 4°C avant d'être utilisée pour la préparation de l'inoculum.

#### **3.2 Préparation de l'inoculum**

Les eaux usées d'amidon (EUA) utilisées pour la préparation de l'inoculum (2% du volume des EUA à fermenter) ont été ajustées à pH 7 avant d'être stérilisées. Une colonie de la souche déjà préparée a été prélevée dans des conditions stériles sous une hotte et mise en culture dans un erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml des eaux usées d'amidon. L'inoculum est agité à 250 tours/min à 30°C durant 8 à 12h. L'inoculum contenu dans l'erlenmeyer de 100 ml est ensuite transféré, dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml d'eaux usées d'amidon incubées dans les mêmes conditions pendant 8 à 12 h. Les cellules provenant de ce milieu, en pleines phases de croissance, seront utilisées comme pré-culture pour la production de Btk dans le fermenteur de 150L.

##### **3.2.1 Test de fiabilité et d'efficacité de l'inoculum durant la fermentation de l'erlenmeyer au bioréacteur de 15L**

Durant la production du biopesticide à base de Btk, une phase de latence dans la croissance des microorganismes se produit. Celle-ci a pour conséquence de réduire le rendement des microorganismes dans la production de spores et surtout de cristaux protéiques. Des séries de tests ont été entreprises afin d'optimiser la cinétique de croissance de l'inoculum et de permettre une croissance immédiate dans le fermenteur final. Ces tests effectués en erlenmeyer ont permis d'analyser la phase optimale pour le transfert de l'inoculum dans le bioréacteur final, la détermination du pourcentage de spores à la fin de la fermentation ainsi que l'entomotoxicité finale obtenue et la présence de cristaux protéiques.

Le développement de l'inoculum est composé de trois étapes : la 1<sup>re</sup> étape consiste au réveil de la souche Btk, la 2<sup>e</sup> étape de fermentation se produit en erlenmeyer et la dernière phase, qui est la 3<sup>e</sup> étape, consiste en une fermentation en fermenteur de 15L.

Durant la 1<sup>re</sup> étape, une colonie de souches Btk conservée à -80°C est étalée sur un milieu Tryptic Soya Broth (TSB), disposée dans une boîte de Pétri, de façon stérile sous la hotte biologique, puis conservée à 30°C pendant 24h dans une étuve.

Dans la 2<sup>e</sup> étape, une colonie de Btk, prélevée sur la boîte de Pétri, estensemencée dans un milieu contenant de l'EUA ou du TSB à 2% du fermenteur final (15L) pendant 48 h.

La 3<sup>e</sup> étape consiste à l'inoculation du fermenteur final (15L) contenant du TSB ou des EUA par le bouillon fermenté issu de la 2<sup>e</sup> étape du procédé. La fermentation dure 48 h, les paramètres tels que l'aération, le pH et la mousse formée sont contrôlés.

Les échantillons issus des fermentations, en erlenmeyer ou en fermenteur, sont prélevés à chaque 3h, durant la phase exponentielle (0 à 12 h) de la croissance des microorganismes, puis à chaque 6h (18h à 48h). L'entomotoxicité, le pourcentage de spores et les cristaux protéiques obtenus à la fin de la fermentation dans le bouillon sont évalués en fonction du milieu utilisé (EUA ou TSB).

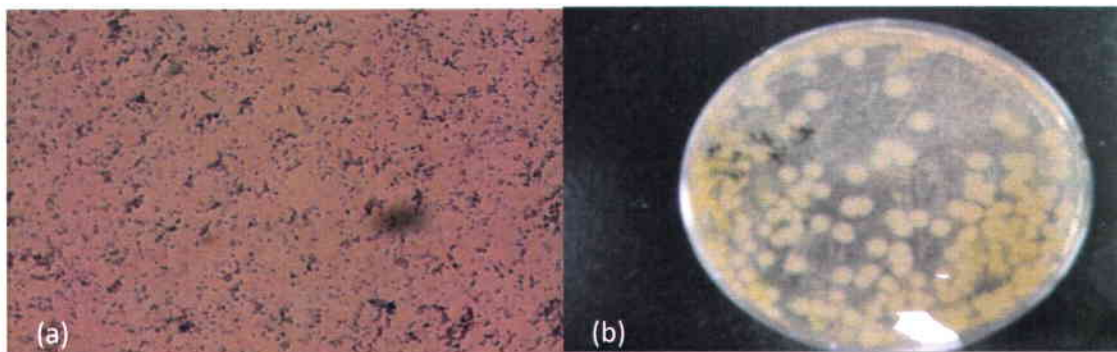
### **3.3 Milieu de croissance de Btk**

Le milieu utilisé pour la croissance de Btk est l'eau usée d'amidon obtenue d'ADM-Ogilvie (Candiac, Québec, Canada). Les eaux usées d'amidon ont été échantillonnées et mises dans la chambre froide à 4°C pour éviter qu'elles ne se détériorent. Les solides totaux et les matières en suspensions ont été déterminés selon la méthode standard (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2005) (Tableau 3).

**Tableau 3 : Caractéristique des eaux usées de l'industrie d'amidon (EUA).**

| Paramètres                         |                                |
|------------------------------------|--------------------------------|
| pH±0,1                             | 3,5                            |
|                                    | <b>Concentration (g/L)</b>     |
| Solides Totaux                     | 15 ± 2                         |
| Solides Totaux volatiles           | 11,2 ± 1                       |
| Les solides en suspension          | 6,2 ± 0,6                      |
| Les solides en suspension volatils | 3,2 ± 0,3                      |
|                                    | <b>Concentration (g/Kg ST)</b> |
| Ct                                 | 374 ± 37                       |
| Nt                                 | 30 ± 3                         |
| N-NH3                              | 0,65 ± 0,1                     |

### 3.4 Problèmes de contaminations microbiennes issus des fermenteurs de 150L et de 2000 L



**Figure 6 : Contamination microbienne du bouillon fermenté (a) vue microscopique et (b) boîte de Pétri (milieu Tryptic Soya Agar).**

- Les fermenteurs de 150L et 2000L, par leurs volumes importants, engendrent des manipulations plus complexes, ce qui se traduit par des difficultés lors de la stérilisation et de l'évacuation des condensats. En effet, différents facteurs peuvent engendrer des désagréments, allant du simple souci technique à l'apparition d'une contamination (Figure 6). La contamination microbienne fut le principal frein à la production du biopesticide Bioval. Les principales causes furent :

- Un évent, qui est un cylindre métallique, permettant le passage de l'évaporat de la cuve vers l'extérieur du fermenteur. Le design de celui-ci n'était pas propice au bon fonctionnement du bioréacteur, puisque l'évaporat qu'il drainait, se retrouver dans la ligne d'entrée d'air.
- La ligne de fond de la cuve du bioréacteur n'est pas toujours stérile, car elle communique avec le drain et l'intérieur de la cuve. Au cas où la pression est négative dans le fermenteur, un retour des eaux provenant du drain est possible.
- Une ligne de transfert qui permet d'inoculer le fermenteur de 2000L à partir du 150L. Celle-ci de longueur très importante se stérilise très mal et peut être source de contamination.
- Un protocole de stérilisation incomplet qui après plusieurs tests a montré beaucoup de failles. L'exemple le plus marquant fut l'observation de points non stérilisés après que celle-ci soit effectuée.

### **3.5 Fermentation dans les bioréacteurs de 15L, 150L et 2000L**

Les fermentations ont été faites dans des bioréacteurs de 15L (volume utile 10L), 150L (volume utile 100L) et 2000L (volume utile 1300L) équipés d'accessoires et de système de contrôle logique programmable (PLC) pour l'oxygène dissous (DO), le pH, l'antimousse, le taux d'aération, la température et de pale d'agitation. Le logiciel (3.5, intellution, USA) permet le contrôle automatique de tous les paramètres via le PLC.

Avant chaque cycle de stérilisation, les sondes de pH (Mettler Toledo, USA) ont été calibrées en utilisant un tampon de pH 4 et 7 (VWR Canada). La sonde à oxygène a été calibrée à zéro en utilisant du sulfite et ramené à 100% en utilisant de l'eau saturée en air. Le bioréacteur est rempli d'eaux usées d'amidon (10L, 100L et 1300L pour les fermenteurs de 15L, 150L et 2000L) et de l'antimousse, à 2% du volume utile, a été ajoutée avant la stérilisation pour éviter la formation de mousse durant la stérilisation. Ensuite, le bioréacteur est stérilisé à 121°C pendant 20 mn. Après le refroidissement du bioréacteur à 30°C, la sonde à DO fut calibrée à 0 puis à 100% en mettant l'agitation et le flux d'air à leur maximum. Le bioréacteur est ensuite inoculé stérilement (2% v/v inoculum) avec la pré-culture de Btk, ce qui représente 200 ml d'inoculum pour le fermenteur de 15L fourni par une fermentation de 7h dans un erlenmeyer de 500 ml. Pour l'inoculum du fermenteur de 150L (100L de volume utile), 2L d'inoculum seront



préparés grâce à des fermentations en erlenmeyer de 14h de durée qui se déroulent en deux étapes. Pendant la 1<sup>re</sup> étape en erlenmeyer de 100 ml, 40 ml d'eaux usées d'amidon seront inoculées par une souche de btk et fermentées pendant 7h. Pendant la 2<sup>e</sup> étape de fermentation de 7h, les 40 ml de bouillons fermentés obtenus permettront d'inoculer deux erlenmeyers de 4L de volume total, pour 1L de volume utilisé par erlenmeyer. Au terme de cette étape, les 4L de bouillons permettront d'inoculer le fermenteur de 150L. Pour l'inoculum du fermenteur de 2000L (1300L de volume utile), 26L d'inoculum fournis par une fermentation de 14h qui se déroule en deux étapes dans deux erlenmeyers de 4L, où le volume utilisé est de 1L par erlenmeyer pendant 7h. Au terme de ces fermentations, les deux erlenmeyers serviront à inoculer le fermenteur de 100L de volume utile. Après 7h de fermentation, 26L seront inoculés dans le fermenteur de 2000L. En vue de maintenir l'oxygène dissous au-dessus de 30%, le flux d'air et l'agitation sont ajustés entre 2 et 2,5L d'air par minute et 300-350 tours par minute. La température est maintenue à 30°C en utilisant de l'eau de refroidissement durant la fermentation. Le pH du milieu est contrôlé et maintenu à 7 par l'ordinateur. Les échantillons sont collectés régulièrement à chaque 6h afin de déterminer les cellules totales, les spores viables, le  $K_{La}$  et l'entomotoxicité.

### 3.5.1 Détermination du coefficient $K_{La}$ , OUR et OTR

Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) a permis d'évaluer la performance de production de Btk dans les EUA. Le  $K_{La}$  est calculé par une méthode dynamique (Mooyoung, 1985). Cette technique consiste à fermer en premier lieu la valve d'aération (DO Off) afin de prendre la valeur de l'oxygène dissous à chaque 10s. Une fois que l'oxygène dissous a atteint 30%, la valve est ré-ouverte et les valeurs de l'oxygène dissous (DO On) sont prises chaque 10s jusqu'à ce que la DO se stabilise. L'équation suivante est utilisée pour le calcul du  $K_{La}$ .

$$C_L = \left( C^* - \frac{1}{K_{La}} \right) * \left( Q_{O_2} X + \frac{\partial C_L}{\partial t} \right) \qquad \frac{\partial C_L}{\partial t} = OTR + OUR$$

$$OTR = K_{La} (C^* - C_L) \qquad OUR = Q_{O_2} \cdot X$$

OTR: Taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide (mmol/l.h)

OUR: Taux de consommation d'oxygène (mmol/l.h)

$K_{La}$ : Coefficient de transfert d'oxygène (mmol/l.h)

$C^*$ : Concentration de l'oxygène à la saturation ( $0,19 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ),  
 $C_L$ : Concentration de l'oxygène dissous dans le milieu ( $\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ).  
 $Q_{O_2}$ : Taux spécifique de consommation d'oxygène ( $\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  
 $X$ : Masse cellulaire ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),

$K_{La}$  est mesuré à chaque prise d'échantillons (toutes les six heures durant les premières 24h et toutes les huit heures pour les dernières 24h).

### 3.6 Estimation des cellules totales et des spores viables

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

Pour le dénombrement des spores, les dilutions à étaler sont mises dans un bain-marie (Buchler Instrument) à  $80^\circ\text{C}$  pendant 10 min et plongées dans de la glace pendant 10mn. Ensuite, 0,1 ml de ces trois dilutions est étalé en duplicata sur un milieu tryptique soja agar (TSA). Les boîtes de Pétri sont incubés à  $30^\circ\text{C}$  durant 24h dans une étuve Imperial II incubateur.

### 3.7 Taux de croissance maximale

Durant la phase exponentielle, le taux de croissance atteint un maximum ( $\mu_{\text{max}}$ ). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante et où le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle). L'aération et l'agitation optimisées permettent un bon transfert d'oxygène, ce qui fait que le taux de croissance peut se prolonger. Concrètement, le taux de croissance maximal est déterminé en traçant la courbe du logarithme népérien de la concentration de la biomasse, lors de la phase exponentielle de la croissance cellulaire en fonction du temps. L'équation de la courbe permet de déterminer le taux de croissance maximale ( $\mu$ ) dont l'unité est égale à  $\text{h}^{-1}$ .

### 3.8 Biopesticide Bioval

La formulation est un lien crucial entre la production de Bt et son application. Celle-ci a une répercussion sur l'aspect économique, la durée de conservation, la facilité d'application et l'efficacité sur le terrain du biopesticide. Divers facteurs environnementaux comme les rayons ultraviolets, la pluie, le pH, la température et la physiologie du feuillage peuvent influencer l'efficacité des formulations de Bt. Ainsi, des préparations de Bt ont été développées pour contrer certains effets néfastes des facteurs environnementaux. Ainsi, le biopesticide commercial devrait être produit de manière économique, avec une stabilité importante dans le temps, avec des principes actifs efficaces contre les larves et résistants à certains effets néfastes de l'environnement. Les préparations ou formulations sont composées du bouillon fermenté centrifugé (spores, cellules, cristaux protéiques, protéines végétatives, protéases...) et de composés chimiques. Les composés chimiques utilisés dans des formulations peuvent être réglementés par des organismes tels que l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis (USEPA). En effet, il existe des composés capables de déstabiliser les propriétés physiques de la formulation ou de nuire à l'environnement. Le xylène était utilisé comme agent de conservation dans des formulations de Bt mais ses impacts sur l'environnement ont conduit à un arrêt de son utilisation. Ainsi, le choix des adjuvants doivent prouver leur impact nul ou minime dans l'environnement ainsi que sa nécessité d'utilisation pour des raisons économiques. Ainsi, pour la formulation du projet BT-INRS appelée formulation Bioval, les différents additifs utilisés sont des agents de suspension pour un meilleur épandage du produit, des phagostimulants pour inciter les larves à consommer le biopesticide, des agents antimicrobiens pour éviter la contamination microbienne du produit et lui assurer toute son intégrité pour une efficacité maximale contre les larves d'insecte et des protecteurs contre les rayons UV pour que les cellules ne soient pas affectées.

La formulation se fera comme suit pour une fermentation dans un fermenteur de 2000L. Après centrifugation, 60L de culot du bouillon sont récupérés. Pour obtenir une viscosité peu élevée et pour faciliter l'épandage du produit, on associe les 60L de culot à 36L de bouillon fermenté et 4L d'additifs chimiques (Tableau 4). Ainsi, pour un volume total de 100L de bouillon obtenu, les additifs ajoutés sont proportionnés. Les polymères qui sont ajoutés comme additifs sont préparés séparément. Ils constituent des additifs denses et s'agglomèrent entre eux. Ainsi, ils sont mélangés avec du bouillon fermenté par petit

volume de 2L de bouillon fermenté pour 5g de polymères. Dans un mixeur, les polymères ajoutés sont de type Carboxymethylcellulose (agent émulsifiant, stabilisant), Xantham gum (permet une meilleure adhésion au feuillage), mélasses (adhérence, anti UV et phagostimulant) et silicate de potassium (combiné avec acétate de sodium : effet tampon sur le pH). Une fois les polymères homogénéisés grâce au bouillon fermenté, l'acide propionique, l'acide sorbique et l'acide acétique qui sont des antimicrobiens sont ajoutés à leur tour dans le culot. Le bouillon restant permettra d'homogénéiser le sorbitol (agent de suspension) et l'acétate de sodium. Toutes les mixtures et le culot du bouillon seront introduits dans une cuve munie d'agitateur pour une homogénéisation optimale. Le produit obtenu sera récolté dans des bouteilles stérilisées et analysé pour vérifier son entomotoxicité et son adhésion aux feuilles d'arbre (test de lessivage). Le produit doit être non corrosif pour les plateformes de stockage et exempt de toute contamination. Si tous les tests sont concluants, le produit Bioval est obtenu. Dans le Tableau 4 ci-dessous, la quantité des différents additifs pour la formulation Bioval liquide de 100L est présentée.

**Tableau 4 : Additifs utilisés pour la préparation de la formulation pour un volume de 100L.**

| <b>Additifs</b>                      | <b>Pourcentage (p/v)</b> | <b>Quantité (Kg)</b> |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Culot du bouillon fermenté concentré | 60                       | 60                   |
| Acide propionique                    | 0,07                     | 0,07                 |
| Acide sorbique                       | 0,01                     | 0,01                 |
| Carboxymethylcellulose               | 0,15                     | 0,15                 |
| Sorbitol                             | 1                        | 1                    |
| Sodium lauryl sulfate                | 0,05                     | 0,05                 |
| Gum Xantham                          | 0,2                      | 0,2                  |
| Mélasses                             | 0,3                      | 0,3                  |
| Silicate de potassium                | 0,25                     | 0,25                 |
| Acétate de sodium                    | 1,7                      | 1,7                  |
| Acide acétique                       | 0,25                     | 0,25                 |
| Bouillon fermenté                    | 36,02                    | 36,02                |

### 3.9 Technique de bioessais

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

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

Les échantillons de formulation à tester sont dilués suivant une série de dilutions présentée au Tableau 5. Les trois dernières dilutions sont utilisées pour la détermination de l'entomotoxicité. Pour ce faire, 1,5 ml de ces échantillons dilués sont mis dans 30 ml de diète stérile contenant 1,5% d'agar stérile (p/v). Après avoir bien agité, 1 ml du mélange est déposé dans des tubes de verres de 15 x 45 mm préalablement stérilisés à l'autoclave et dont les bouchons de plastique sont finement troués et stérilisés aux rayons ultra-violet. Un groupe de 20 tubes est utilisé pour chaque dilution. Un groupe de 25 tubes est utilisé pour le blanc contenant 1 ml de diète seule, un second groupe de 25 tubes est utilisé pour un contrôle négatif dont les tubes contiennent 1 ml du milieu synthétique stérile, un troisième groupe de 25 tubes est utilisé comme contrôle, contenant 1 ml de bouillon fermenté. Le Foray 76 est ajouté (1,5 ml) sans dilution dans la diète (30 ml).

**Tableau 5 : Techniques de bioessais de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE).**

| Tubes                         | Contrôle | 0 | 1   | 2             | 3             | 4             | 5             |
|-------------------------------|----------|---|-----|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Eau distillée                 | -        | 1 | 4,5 | 4,5           | 4,5           | 4,5           | 4,5           |
| Dilution en série             |          |   |     |               |               |               |               |
| Éch (ml)                      | -        | 1 | 0,5 | 0,5 du tube 1 | 0,5 du tube 2 | 0,5 du tube 3 | 0,5 du tube 4 |
| Éch dilués (ml)               | -        | - | -   | -             | -             | 1,5           | 1,5           |
| Diètes (ml)                   | 30       | - | -   | -             | -             | 30            | 30            |
| Diètes ajoutées (ml)          | 1        | - | -   | -             | -             | 1             | 1             |
| Tubes/larves d'entomotoxicité | 25       | - | -   | -             | -             | 20            | 20            |

Sur une surface propre et proche d'une flamme pour éviter la contamination par des moisissures, une larve est placée dans chaque tube avec un pinceau propre et très fin. Les tubes sont placés à la température ambiante de la pièce et le nombre de morts est compté après 9 jours d'élevage (Figure 7). L'entomotoxicité est rapportée en pourcentage et en UI/ $\mu$ l respectivement selon un calcul présenté sur le protocole exposé par Barnabé (2000).

**Entomotoxicité (UI/  $\mu$ l) =**

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



**Figure 7 : Échantillons sur la mesure de l'entomotoxicité de Btk HD-1 sur les larves de TBE**

### 3.9.1 Estimation de la production de delta endotoxine

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



cristaux de protéines du culot ont été dissous avec 0,05N NaOH pendant 3 heures à 30°C. La suspension a été centrifugée à 10 000g pendant 10mn à 4°C et le culot contenant les spores et les débris de cellules ont été écartés. Le surnageant contenant les cristaux de protéine d'insecticide a été utilisé afin de déterminer la concentration de delta-endotoxine par la méthode de Bradford en utilisant du sérum albumine bovin comme standard de protéine.

Pour la préparation du réactif de Bradford de concentration 0.5X il faut :

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 1) Bleu de Coomassie G250 | 0,05% (w/v) |
| 2) Éthanol                | 25% (v/v)   |
| 3) Acide phosphorique     | 42,5% (v/v) |

Le volume final devrait être de 1L et la solution obtenue devrait être filtrée à travers un papier filtre de Whatman n° 2. Le réactif devrait être gardé à l'abri de la lumière et conservé dans une chambre froide à 4°C.

### **3.9.2 Taille des particules**

Le matériel utilisé afin de déterminer la taille des particules est une machine Horiba (laser scattering particle size distribution analyser LA-950). Dès le démarrage de la machine, l'appareil mesure la transmittance du liquide à analyser. Puis il active automatiquement la vitesse de la circulation, la vitesse de l'agitation de même que la forme de la distribution. Ensuite, il faut introduire la matière à analyser (sous forme liquide) dans l'espace réservée à cet effet. Ainsi, grâce à la base de données de types de matériaux préenregistrés, la machine pourra situer l'échantillon à analyser. De ce fait, après l'ajout de l'échantillon, il faudra choisir la nature de l'index pour laquelle l'échantillon devra être analysé. Dans le cas des eaux usées d'amidon, l'index choisi est le liposome. Par la suite, les résultats obtenus seront la taille principale, la taille médiane, la variance et le mode des particules.

### **3.9.3 Potentiel zêta**

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert en raison des ions qui l'entourent lorsqu'elle est en solution, ce qui représente un bon indicateur des interactions entre particules, et donc de la stabilité des colloïdes, telles que les

émulsions (selon la théorie développée DLVO par Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek, en 1940, qui propose que la stabilité des particules en suspension dépend du potentiel total d'interaction).

La mesure du potentiel zêta permet d'étudier le comportement des émulsions et des suspensions (stabilité, glaçage, coalescence, agglutination) et ainsi de résoudre certains problèmes de formulation. Le potentiel zêta peut être positif (cationique) ou anionique négatif (Hanaor *et al.*, 2012). Le Zetaphoremeter IV, Zetacompact Z8000 (CAD instrumentation France) a été utilisé pour mesurer le potentiel zêta des particules colloïdales en suspension dans un liquide en déterminant le taux de particules en mouvement, suivant un champ électrique connu.

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

Les échantillons mélangés et dilués ont été introduits dans le Zêta-photomètre (vannes ouvertes) au moyen d'une seringue. L'analyse a été faite immédiatement après le mélange pour éviter les bulles dans la cellule. Les vannes doivent être fermées pour stabiliser l'échantillon avant d'appliquer un champ électrique et de l'observer sur l'écran. Le Tableau 6 indique les valeurs importantes pour la stabilité des colloïdes au cours de leur dispersion dans les milieux liquides (Greenwood et Kendall, 1999; Hanaor *et al.*, 2012).



**Tableau 6 : Potentiel zêta (mV) et stabilité du colloïde.**

| Potentiel zêta [mV] | Stabilité du colloïde             |
|---------------------|-----------------------------------|
| 0 à ± 5             | Coagulation rapide ou floculation |
| ±10 à ± 30          | Instabilité naissante             |
| ± 30 à ± 40         | Stabilité modérée                 |
| ± 40 à ± 60         | Bonne stabilité                   |
| Plus de ± 61        | Excellente stabilité              |

### 3.9.4 Viscosité

La viscosité a été mesurée à l'aide du « Brookefield DVII pro » qui est un viscosimètre équipé d'un logiciel Rheocalc 32, SC-34 broche (petit adaptateur pour échantillon). Le port de la cuvette pour échantillon a été utilisé pour mesurer la viscosité (Gnepe *et al.*, 2011; Gnepe *et al.*, 2012). La viscosité souhaitée de la formulation permettra une répartition uniforme des spores sur les feuilles et favorisera un épandage plus aisé.

### 3.9.5 Solides totaux

La détermination des solides totaux se fait par la mesure du carbone organique total et du carbone minéral total. Elle se fait en prenant un volume connu de notre échantillon qui est mis dans une coupole en aluminium dont on connaît le poids initial à vide. Celle-ci est mise dans un four à une température de 105°C pendant 24 heures. Le poids de la coupole est pesé une fois de plus. La différence entre les deux poids (initial et final) divisée par le volume de l'échantillon de départ, donne la masse des solides totaux en g/l (APHA *et al.*, 1989).

$$\text{Calcul des solides totaux (g / L)} : \frac{\text{Poids final(g)} - \text{Poids initial(g)}}{\text{volume initial de l'échantillon(l)}} \times 1000$$

### 3.9.6 Matières en suspension

La mesure de la matière en suspension se fait en centrifugeant un volume connu du bouillon obtenu après fermentation à 9 000g pendant 15mn. Le culot obtenu qui contient les spores et les cellules et qui est représentatif du carbone organique total est mesuré par la suite. Tout le culot est mis dans une coupole d'aluminium et mis au four à 105°C pendant 24 heures. La différence des poids (initial et final) de la coupole obtenue est divisée par le volume initial. Ceci donne la valeur de la matière en suspension obtenue (APHA *et al.*, 1989).

$$\text{Calcul des matières en suspension (g/L): } \frac{\text{Poids final(g)} - \text{Poids initial(g)}}{\text{volume initial (l)}} \times 1000$$

### 3.9.7 Analyses statistiques

Pour le calcul des erreurs standards des différences significatives durant les analyses, le test de Turkey-Kramer a été utilisé. Les bases de données sont sujettes à une analyse de variance (ANOVA). Les valeurs  $P < 0,05$  sont considérées comme significatives. Les résultats observés ci-dessous sont issus de triplicatas.

## 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Test de fiabilité et d'efficacité de l'inoculum

L'inoculum est le point de départ d'une fermentation. Lorsque celui-ci tarde à être transféré dans le bioréacteur, de longues phases de latence sont observées. Elles sont généralement dues à un appauvrissement du milieu nutritif dans l'inoculum. La présence importante de spores au détriment des cellules est la résultante de cet appauvrissement. Des tests de fiabilité et d'efficacité (Figure 8) permettront d'obtenir un inoculum de qualité.

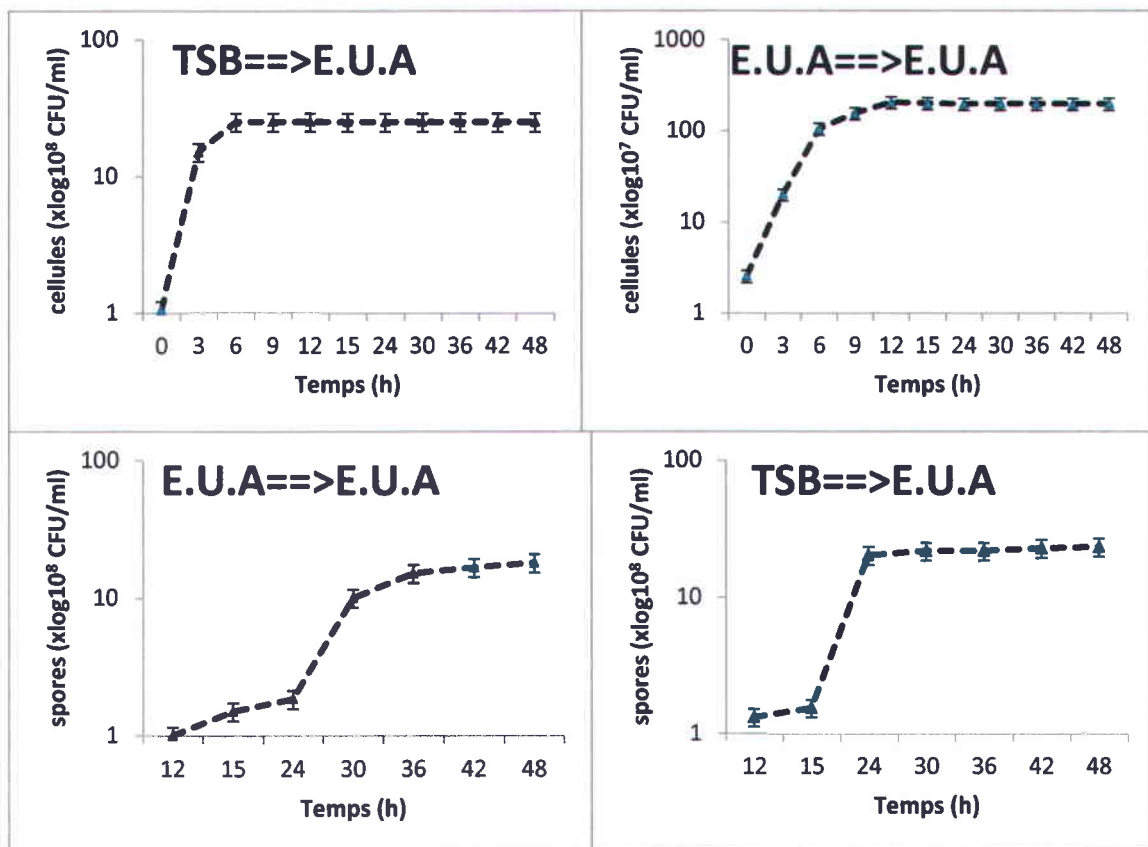


Figure 8 : Étude comparative de la croissance de Btk dans 2 milieux initiaux (EUA et TSB) et un milieu final EUA.

Durant la fermentation où les eaux usées d'amidon ont été utilisées, il existe une croissance exponentielle des cellules Btk immédiate de 0h à 6h (de 0 à  $1,05 \times 10^9$  CFU/ml) grâce à la présence abondante de nutriments disponibles pour les cellules. Une

phase stationnaire entre 12h et 36h ( $1,98 \times 10^9$  CFU/ml) est observée. Elle est due à la raréfaction des sources nutritives et à un pH qui augmente, car non contrôlé.

La formation des spores débute à partir de 12h ( $1,1 \times 10^8$  CFU/ml). La formation de celle-ci continuera jusqu'à 48h ( $1,79 \times 10^9$  CFU/ml) de fermentation. Le pourcentage de sporulation dans ces conditions atteint 90%. Celle-ci débute à 12h car le milieu s'appauvrit et les conditions deviennent difficiles pour la croissance microbienne. Pour s'adapter à ces changements, les microorganismes sporulent afin de dépenser le minimum d'énergie nécessaire à leur métabolisme.

Lors de la fermentation en milieu TSB (initial) et EUA (final) en erlenmeyer, la croissance des cellules de Btk a été immédiate durant la phase exponentielle de  $1,05 \times 10^8$  CFU/ml (à 0h) à  $2,5 \cdot 10^9$  CFU/ml à 6h. Ensuite, la croissance est stationnaire à  $2,48 \times 10^9$  entre 6h et la fin de la fermentation (48 h).

La formation de spores débute à 12h ( $1,33 \times 10^8$  CFU/ml), augmente légèrement jusqu'à 15h ( $1,55 \times 10^8$  CFU/ml) et se poursuit de façon exponentielle jusqu'à 24h ( $2 \times 10^9$  CFU/ml). Cette croissance tend à se stabiliser à partir de 24h à 48h de fermentation ( $2 \times 10^9$  à  $2,3 \times 10^9$  CFU/ml). Cela est dû à la maturation des spores. Le pourcentage de sporulation trouvé atteint 93%.

**Tableau 7 : Paramètres de culture de Btk durant la fermentation en erlenmeyer.**

| Âge de la culture | EUA → EUA      |              | % de spore | TX UI/ml | TSB → EUA      |               | % de spore | TX UI/ml |
|-------------------|----------------|--------------|------------|----------|----------------|---------------|------------|----------|
| Heure             | Cellule CFU/ml | Spore CFU/ml |            |          | Cellule CFU/ml | Spores CFU/ml |            |          |
| 0                 | 2,55E+07       |              |            |          | 1,05E+08       |               |            |          |
| 3                 | 2,00E+08       |              |            |          | 1,50E+09       |               |            |          |
| 6                 | 1,05E+09       |              |            |          | 2,50E+09       |               |            |          |
| 9                 | 1,55E+09       |              |            |          | 2,50E+09       |               |            |          |
| 12                | 2,05E+09       | 1,00E+08     |            |          | 2,50E+09       | 1,33E+08      |            |          |
| 18                | 2,00E+09       | 1,50E+08     |            |          | 2,49E+09       | 1,55E+08      |            |          |
| 24                | 1,97E+09       | 1,85E+08     |            |          | 2,49E+09       | 2,00E+09      |            |          |
| 30                | 1,98E+09       | 1,00E+09     |            |          | 2,49E+09       | 2,15E+09      |            |          |
| 36                | 1,98E+09       | 1,50E+09     |            |          | 2,48E+09       | 2,15E+09      |            |          |
| 42                | 1,97E+09       | 1,65E+09     |            |          | 2,48E+09       | 2,25E+09      |            |          |
| 48                | 1,98E+09       | 1,79E+09     | 90         | 20235    | 2,48E+09       | 2,30E+09      | 93         | 21243    |

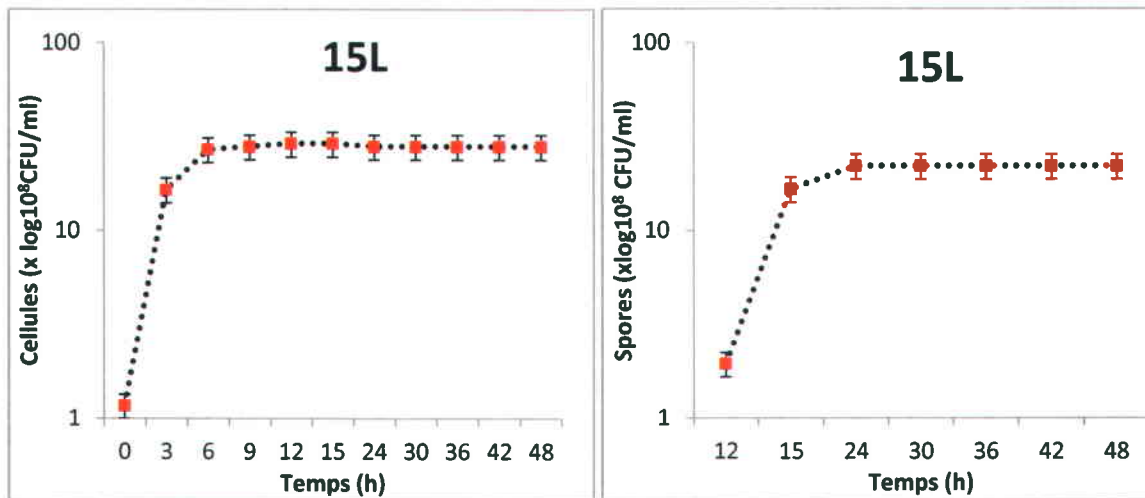
Au terme des deux fermentations, les résultats du Tableau 7 montrent que les cellules et les spores obtenues avec le milieu TSB sont plus élevées que celles obtenues avec le milieu EUA, ce qui peut s'expliquer par la disponibilité et l'accessibilité des nutriments,

plus importants dans le TSB que dans les EUA. Les cristaux protéiques, protéines responsable du caractère larvicide, sont synthétisés durant la sporulation.

Les résultats obtenus à la suite de ces expériences permettent de dire que la fermentation de départ dans le TSB permettrait de rendre dynamique les cellules en leur fournissant un milieu complet et les nutriments dont ils ont besoin pour leur croissance. Toutefois, le transfert du milieu TSB vers EUA devrait se faire à un temps de fermentation de 7h. Ainsi, les cellules seront en phase de croissance dynamique et on notera une absence de formation de spores. L'entomotoxicité et le pourcentage de sporulation trouvés sont donc plus importants dans les fermentations TSB→EUA (Tableau 8).

**Tableau 8 : Paramètres de culture de Btk durant la fermentation en 15L.**

| Âge de la culture (h) | TSB →EUA        |               |     | Entomotoxicité UI/ml |  |
|-----------------------|-----------------|---------------|-----|----------------------|--|
|                       | Cellules CFU/ml | Spores CFU/ml |     | 23428                |  |
| 0                     | 1,17E+08        | 0             |     |                      |  |
| 3                     | 1,65E+09        | 0             |     |                      |  |
| 6                     | 2,70E+09        | 0             |     |                      |  |
| 9                     | 2,80E+09        | 0             |     |                      |  |
| 12                    | 2,90E+09        | 1,95E+08      |     |                      |  |
| 15                    | 2,90E+09        | 1,66E+09      |     |                      |  |
| 24                    | 2,80E+09        | 2,20E+09      |     |                      |  |
| 30                    | 2,80E+09        | 2,20E+09      |     |                      |  |
| 36                    | 2,80E+09        | 2,20E+09      |     |                      |  |
| 42                    | 2,80E+09        | 2,20E+09      |     |                      |  |
| 48                    | 2,80E+09        | 2,20E+09      | 78% |                      |  |



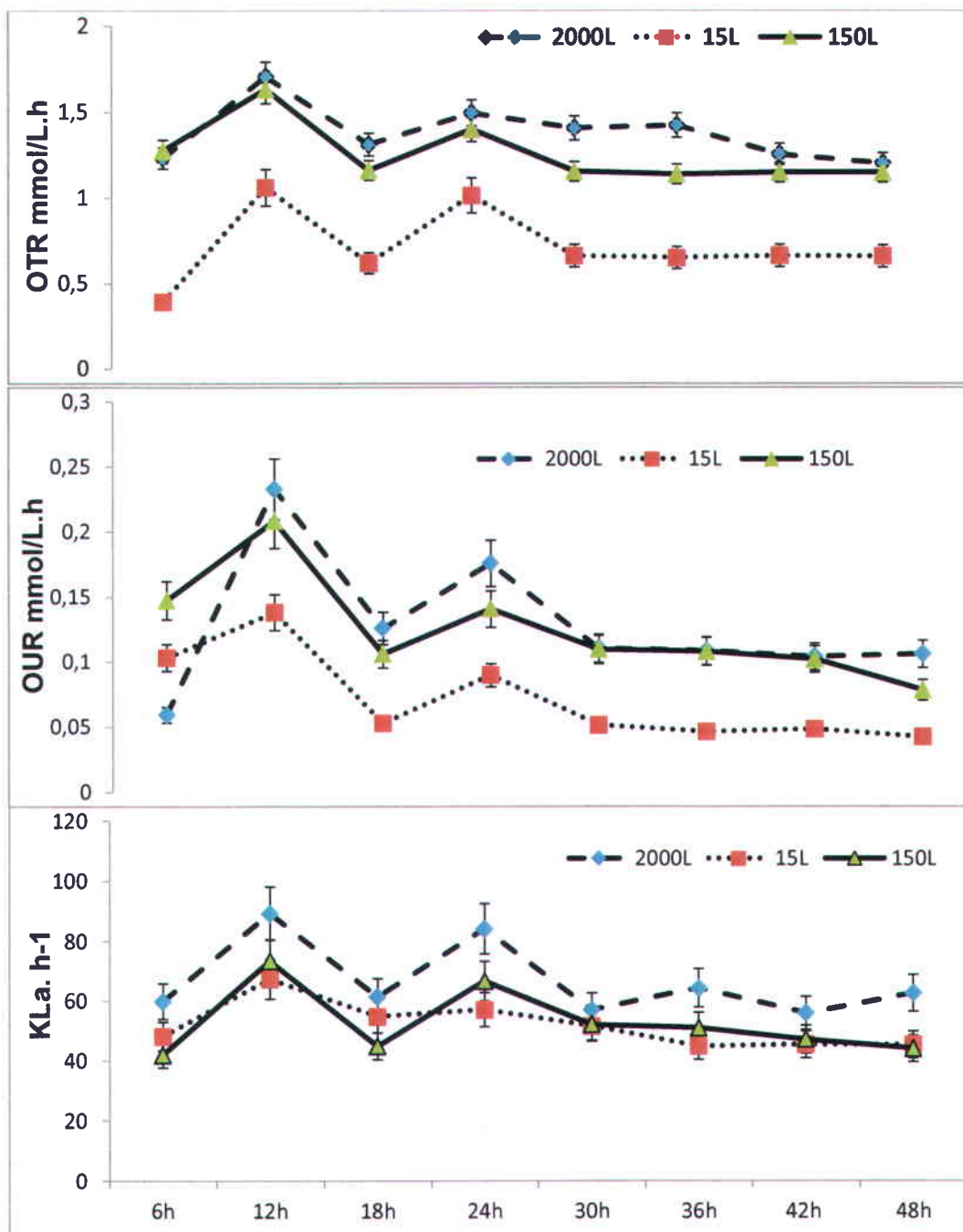
**Figure 9 : Étude comparative des cellules et des spores dans le bioréacteur de 15L dans un milieu TSB de départ et un milieu final EUA.**

Les résultats de la croissance des cellules totales (Figure 9) montrent une évolution rapide et progressive de 0h ( $1,17 \times 10^8$  CFU/ml) à 12h ( $2,90 \times 10^9$  CFU/ml) grâce à la disponibilité de nutriments et à leur accessibilité. Ensuite, cette croissance se stabilise à  $2,90 \times 10^9$  CFU/ml, entre 12h à 15h, puis une légère baisse à  $2,8 \times 10^9$  CFU/ml qui se maintient de 24h à 48h. La croissance des spores débute à 12h ( $1,95 \times 10^8$  CFU/ml) et augmente jusqu'à 24h ( $2,20 \times 10^9$  CFU/ml). Ensuite, la maturation des spores se produit et la croissance des spores demeure stationnaire à  $2,20 \times 10^9$  CFU/ml jusqu'au terme de la fermentation à 48h.

Le pourcentage de spores à 48h représente 78% et l'entomotoxicité 23 428 UI/ml. Le nombre de cristaux protéiques observé est plus important que dans les fermentations en erlenmeyer. Il est intéressant de noter que l'entomotoxicité obtenue en 15L est plus importante que dans les erlenmeyers, alors que ces derniers présentent des pourcentages de spores plus élevés que dans le 15L. Cependant, il faut noter que les cristaux protéiques obtenus sont plus importants en 15L et ils agissent en synergie avec les spores. La présence plus importante en cristaux protéiques est certainement due au contrôle de l'oxygène (apport contrôlé et régulier) dans le fermenteur. Le contrôle du pH permet également de préserver les cellules des changements de conditions du milieu.

## 4.2 Concentration en mmol/l.h de l'OTR, l'OUR et le $K_{La}$ dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L

La Figure 10 présente une étude comparative des résultats du coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ), du taux de consommation d'oxygène (OUR) et du taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide (OTR) durant les fermentations effectuées dans les 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L).



**Figure 10 : Profils du  $K_{La}$ , OUR et OTR durant la fermentation des EUA de 15 L et 150 L et 2000 L (erreur de la méthode:10%).**

L'allure des valeurs de ces 3 paramètres est similaire et irrégulière à cause des nombreuses variations observées au niveau de l'agitation et du débit d'air apporté durant la fermentation pour maintenir au-dessus de 30% la concentration de l'oxygène dissous (OD). Pour Fyferling (2007), ces irrégularités peuvent être dues aux propriétés rhéologiques, physico-chimiques et biologiques du milieu de culture. Les résultats obtenus sont issus de la moyenne de 3 fermentations.

Ainsi, les valeurs obtenues de l'OUR s'expliquent du fait que les cellules bactériennes consomment beaucoup d'oxygène, pour fournir de l'énergie nécessaire à la croissance cellulaire. Le fait que les valeurs soient supérieures en 2000L par rapport au 150L et 15L montrent qu'il y'a plus de cellules et de spores dans ce fermenteur, ce qui peut être expliqué par une meilleure agitation et une meilleure aération dans le fermenteur de 2000L. Egalement, c'est le seul fermenteur où l'inoculum est fait dans un bioréacteur (150L), ce qui permet que les conditions de départ soient réunies (contrôle du pH, aération fournie). Ces deux paramètres constituent les paramètres critiques pour une bonne croissance de Btk. Les pics obtenus à 12h et à 24h correspondent respectivement à la phase de croissance exponentielle des cellules microbiennes et à la phase de maturation des spores (Vu, 2009). L'OTR qui mesure le transfert d'oxygène atteint son maximum dans le fermenteur de 2000L. Ceci s'explique par la colonne d'eaux usées d'amidon plus importantes et favorisant la solubilisation de l'oxygène dissous. Le transfert de la phase gazeuse vers les cellules microbiennes en passant par la phase liquide est par conséquent facilité. Le  $K_{La}$  qui mesure la capacité d'oxygénation montre une meilleure oxygénation en 2000L par rapport aux autres fermenteurs. En effet le transfert d'oxygène s'effectue mieux car les paramètres d'agitation et d'aération sont plus performants dans le bioréacteur de 2000L. Ainsi, ces explications montrent que le bioréacteur de 2000L présente les meilleurs résultats en termes de  $K_{La}$ , OUR et OTR par rapport aux 15L et au 150L.



### 4.3 Concentration des cellules totales et des spores viables

La Figure 11 présente, les résultats de la culture des cellules et des spores de Btk durant la fermentation qui s'est effectuée dans les 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L).

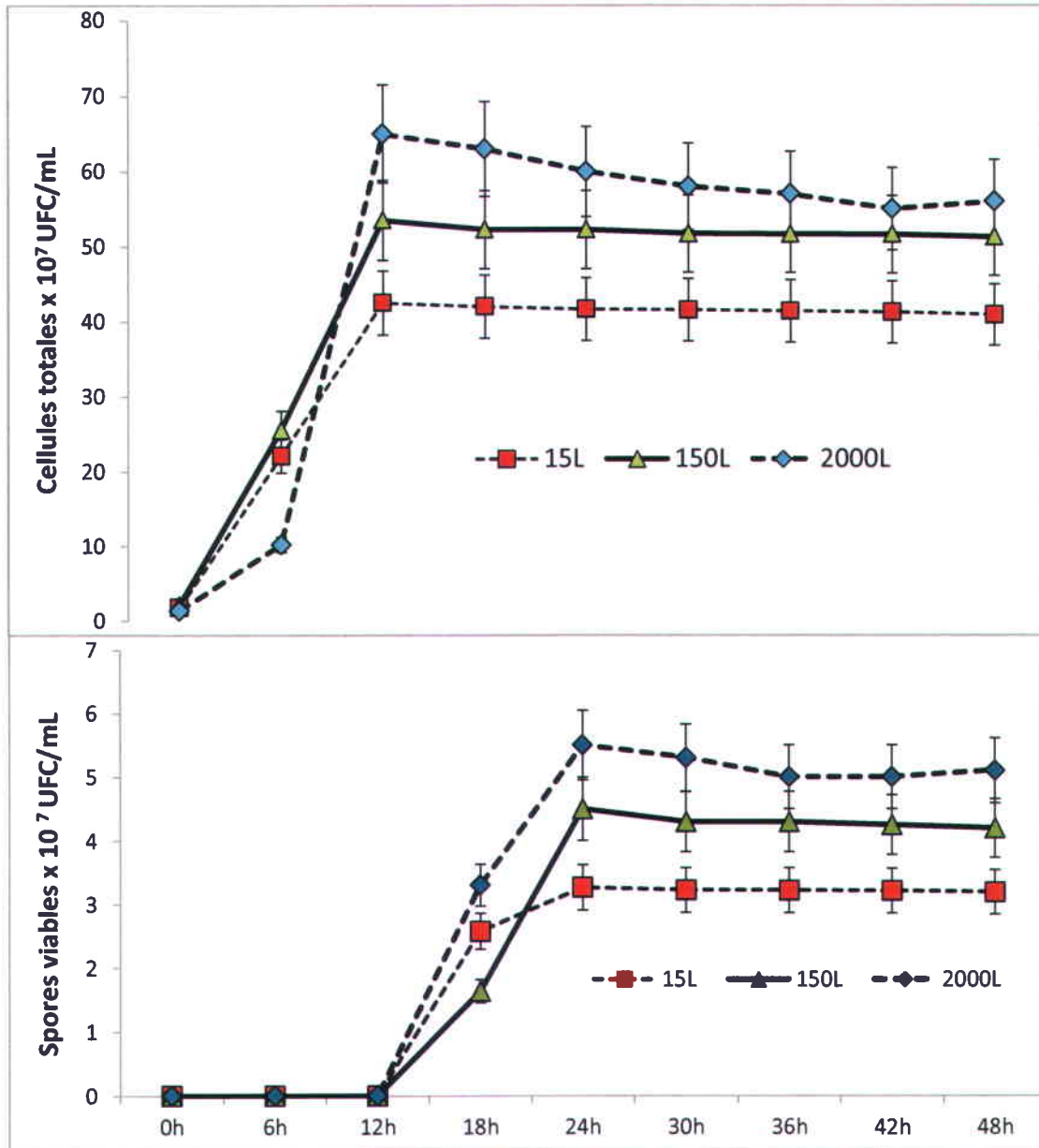


Figure 11 : Profils de la croissance cellulaire et de la sporulation de Btk HD-1 au cours de la fermentation en bioréacteur de 150L et 15L (erreurs de la méthode : 10% à 11%).

La croissance cellulaire est exponentielle dans le bioréacteur de 2000L ( $1,33 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$  à  $6,5 \times 10^8 \pm 0,7 \times 10^8$  UFC/ml en cellules totales et 0 UFC/ml en spores), de 150L (de  $2,1 \times 10^7 \pm 0,23 \times 10^7$  à  $5,35 \times 10^8 \pm 0,58 \times 10^8$  UFC/ml en cellules totales et 0 UFC/ml en spores) et de 15L (de  $1,33 \times 10^7 \pm 0,14 \times 10^7$  à  $4,25 \times 10^8 \pm 0,46 \times 10^8$  UFC/ml en cellules totales et 0 UFC/ml en spores) de 0 à 12 h. De 12 à 48 h, la croissance cellulaire devient stationnaire et commence à chuter pour le 2000L (de  $6,5 \times 10^8 \pm 0,71 \times 10^8$  à  $5,6 \times 10^8 \pm 0,61 \times 10^8$  UFC/ml), le 150L de ( $5,35 \times 10^8 \pm 0,58 \times 10^8$  à  $5,125 \times 10^8 \pm 0,56 \times 10^8$  UFC/ml) et le 15L (de  $4,25 \times 10^8 \pm 0,46 \times 10^8$  à  $4,09 \times 10^8 \pm 0,45 \times 10^8$ ) entre 12h et 48h. Durant cette période, les spores commencent à croître passant de 0 à  $5,5 \times 10^8 \pm 0,6 \times 10^8$  entre 12h et 24h. Puis la croissance se stabilise de 24h à 48h passant de  $5,5 \times 10^8 \pm 0,6 \times 10^8$  à  $5,1 \times 10^8 \pm 0,56 \times 10^8$  UFC/ml pour le 2000L. Pour le 150L, la croissance cellulaire passe de  $5,35 \times 10^8 \pm 0,58 \times 10^8$  à  $5,13 \times 10^8 \pm 0,56 \times 10^8$  UFC/ml entre 12h et 48h et le nombre de spores de 0 à  $4,5 \times 10^8 \pm 0,49 \times 10^8$  entre 12h et 24h et de  $4,5 \times 10^8 \pm 0,49 \times 10^8$  à  $4,2 \times 10^8 \pm 0,46 \times 10^8$  de 24h à 48h. Enfin, pour le 15L de 12h à 48h la croissance cellulaire passe de  $4,25 \times 10^8 \pm 0,46 \times 10^8$  à  $4,09 \times 10^8 \pm 0,45 \times 10^8$  UFC/ml alors que la croissance des spores atteint  $3,27 \times 10^8 \pm 0,36 \times 10^8$  UFC/ml à 24h et  $3,19 \times 10^8 \pm 0,35 \times 10^8$  à 48h. La croissance cellulaire de Btk atteint un maximum à 12h de fermentation. Les nutriments présents dans le milieu favorisent une croissance exponentielle des bactéries. Durant cette phase, le fermenteur de 2000L montre un nombre cellulaire plus important par rapport aux autres fermenteurs, ce qui peut s'expliquer par la puissance des pâles d'agitation et la réduction des bulles d'air lors de l'oxygénation qui permettent d'augmenter le transfert d'oxygène durant la phase exponentielle de la croissance de BTK et également lors de la maturation de spores (Parakulsuksatid, .2000).

#### 4.4 Taux de croissance maximale

Le Tableau 9 présente une étude comparative du taux de croissance maximale cellulaire observé dans les 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L). Les résultats observés sont sensiblement proches et varient de  $0,40 \pm 0,02$  à  $0,434 \pm 0,022$  avec une faible différence entre eux.

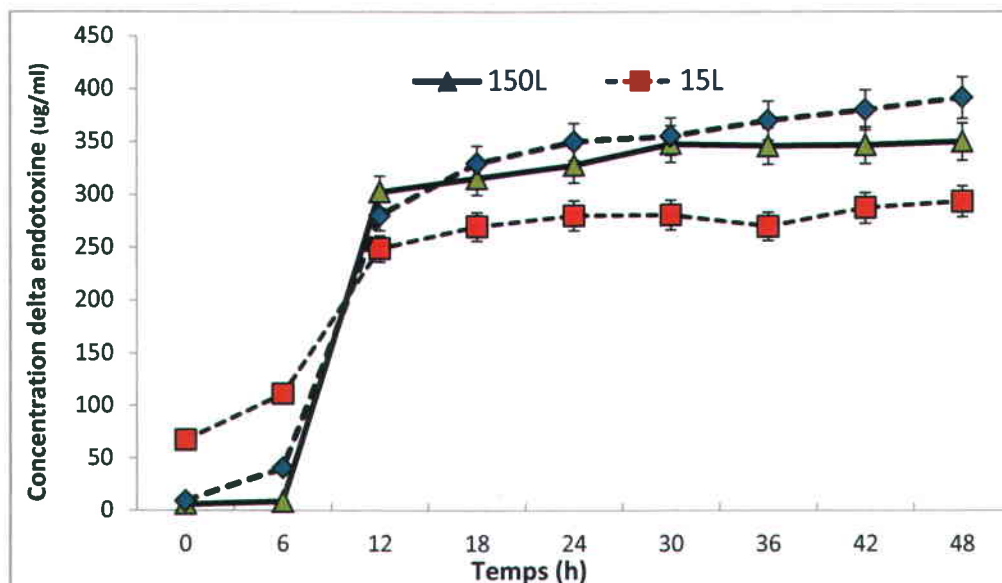
**Tableau 9 : Mesure du taux de croissance maximale cellulaire en h-1 dans les fermenteurs.**

| Bioréacteur de 15L | Bioréacteur de 150L | Bioréacteur de 2000L |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| 0,40 ± 0,02        | 0,43 ± 0,022        | 0,434 ± 0,022        |

Cela s'explique par le fait que la croissance cellulaire soit excellente et se déroule pareillement dans les 3 bioréacteurs durant la phase exponentielle. Ceci démontre que durant la croissance exponentielle, le transfert d'oxygène qui est le facteur limitant s'effectue très bien grâce à une bonne aération (toujours au-dessus de 30%) et une bonne agitation (comprise entre 30% à 90%). Ces deux paramètres permettent une bonne oxygénation du milieu. En effet, les travaux de Yezza (2005) ont montré qu'en dessous de 30% d'aération et 30 à 90% d'agitation, il existe une forte probabilité d'obtenir une mauvaise oxygénation du milieu qui inhibe la croissance des cellules. Par contre, l'oxygène se transfère mieux dans le fermenteur de 2000L. Ceci montre que l'oxygénation est optimale dans ce fermenteur.

#### **4.5 Concentration de delta endotoxine dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L.**

La Figure 12 présente les résultats de la concentration de delta endotoxine observés dans le bouillon fermenté. Ces valeurs ont été obtenues grâce à des échantillons prélevés à chaque 6 heures pendant les 48 heures de fermentation. Cette étude s'est effectuée en fonction du temps de fermentation dans les 3 bioréacteurs (15L, 150L et 2000L).



**Figure 12 : Concentration de delta endotoxine dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L (erreur de la méthode 5%).**

La concentration de delta endotoxine augmente dans le bioréacteur de 2000L (de  $9,23 \pm 0,9$  à  $40,6 \pm 4$  µg/ml), de 15L (de  $67 \pm 7$  à  $111 \pm 11$  µg/ml) et baisse dans le bioréacteur de 150L ( $9,23 \pm 0,9$  à  $8,26 \pm 0,8$  µg/ml) de 0h à 6h. Puis on observe, de façon générale, une augmentation de la concentration de delta endotoxine de 6h à 48h pour le 2000L ( $40,6 \pm 4$  µg/ml à  $391 \pm 39,2$  µg/ml), pour le 150L (de  $8,26 \pm 0,8$  µg/ml à  $350 \pm 35$  µg/ml) et pour le 15L ( $111 \pm 11$  µg/ml à  $293 \pm 29,3$  µg/ml).

La synthèse des cristaux protéiques débutent au début de la croissance des spores et se finalisent lors de la maturation des spores (Yezza, 2005). Ainsi la concentration de delta endotoxine reste faible au début de la fermentation et augmente à la fin de la fermentation. La concentration de delta endotoxine est en effet plus élevée en 2000L car elles sont synthétisées durant la phase stationnaire qui est la phase de sporulation (Vu. 2009). Ainsi, le nombre de spores élevé entraîne une concentration en delta endotoxine importante.

#### 4.6 Entomotoxicité

Le Tableau 10 présente les résultats de l'entomotoxicité obtenus avec la formulation Bioval, produite avec les 3 différents bioréacteurs. Ces résultats montrent les cellules et

les spores obtenus après centrifugation du bouillon fermenté et formulation du biopesticide Bioval.

**Tableau 10 : Concentration de l'entomotoxicité avec Bioval produit dans le 15L et le 150L.**

| Milieux      | Cellules totales<br>10 <sup>9</sup> UFC/ml | Spores viables<br>10 <sup>9</sup> UFC/ml | Entomotoxicité IU/μl |
|--------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|
| Bioval 15L   | 4.3±0,21                                   | 3.95±0,2                                 | 22400 ± 1100         |
| Bioval 150L  | 5.13±0,26                                  | 4.26±0,21                                | 24100 ± 1200         |
| Bioval 2000L | 4,25±0.21                                  | 3,19±0,16                                | 20200 ± 1000         |
| Foray 76B    | 4,20± 0,21                                 | 3,15 ± 0,16                              | 20000 ± 999          |

Pour le 2000L, les cellules sont de  $4,25 \times 10^9 \pm 0.4 \times 10^9$  et les spores de  $3,19 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$  UFC/ml et l'entomotoxicité de  $20200 \pm 2000$  UI/μl. Pour le 150 L le nombre de cellules et de spores sont de  $5,13 \times 10^9 \pm 0.5 \times 10^9$  et  $4,26 \times 10^9 \pm 0.4 \times 10^9$  UFC/ml, l'entomotoxicité est de  $24100,65 \pm 2500$  UI/ μl. Pour le 15L le nombre de cellules et de spores sont de  $4,3 \times 10^9 \pm 0.4 \times 10^9$  et  $3,95 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$  UI/ μl.

Le nombre de spores et de cellules obtenus dans le 150L et le 15L sont plus élevés que ceux du 2000L car la centrifugation continue n'est pas optimisée ce qui fait perdre des cellules et spores par rapport à la centrifugation en batch où l'on récupère le maximum de spores et de cellules. Ces résultats reflètent l'entomotoxicité au niveau du 2000L, du 15L et du 150L car plus le nombre de spores dans le biopesticide est élevé plus celui-ci devient larvicide (Yezza, 2005). Cependant tous les résultats obtenus lors des différentes fermentations demeurent plus importants que ceux du produit standard Foray 76 B.

#### 4.7. Paramètres physiques du biopesticide Bioval

Le Tableau 11 montre les solides totaux, les matières en suspension, les tailles des particules et la viscosité des formulations Bioval produites avec les bioréacteurs de 15 L, 150L et 2000L.

**Tableau 11 : Paramètres comparatifs après fermentation.**

| Paramètres                                   | Bioval      |             |             | Foray      |
|----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                                              | 2000L       | 150L        | 15L         |            |
| Solides totaux des eaux usées d'amidon (g/L) | 15,8 ± 1,6  | 15,4 ± 1,54 | 15,6 ± 1,56 | -          |
| Potentiel zêta (mV)                          | -65,5 ± 9,8 | -62,8 ± 9,4 | -61,3 ± 9,2 | -31,7± 4,8 |
| Matières en suspension (g/L)                 | 25,5 ± 2,55 | 33,5 ± 3,35 | 27,6 ± 2,8  | 22,5± 2,25 |
| Taille des particules (µm)                   | 17,4 ± 1,22 | 15,2 ± 1,06 | 13,4 ± 0,9  | 4,3± 0,3   |
| Viscosité (mPa.s)                            | 150 ± 10,5  | 241 ± 16,8  | 225 ± 15,8  | 130± 9,12  |

Les résultats observés dans le Tableau 11 sont excellents en termes de matières en suspension, de potentiel zêta, de taille de particules et de viscosité pour les différents bioréacteurs : pour le 2000L (-65,5 ± 9,8 potentiel zêta; 25,5 ± 2,55 g/L de MES; 17,45 ± 1,22 µm de taille des particules et 149,48 ± 10,46 de viscosité), pour le 15L (-61,3 ± 9,19 potentiel zêta; 27,6 ± 2,8g/L de MES; 13,4 ± 0,94 µm de taille des particules et 225 ± 15,8 de viscosité) et pour le 150L (-62,8 ± 9,4 potentiel zêta; 33,5 ± 3,35g/L de MES; 15,2 ± 1,06 µm de taille des particules et 241 ± 16,9 de viscosité).

Les matières en suspension obtenues après formulation dans des fermenteurs de 2000L (25,5 ± 2,6 g/L), 150L (33,5 ± 3,35 g/L) et 15L (27,6± 2,76 g/L) montrent une présence de solides totaux plus importants au niveau des fermenteurs de 150L et de 15L. En effet, lors de la centrifugation en batch du bouillon fermenté, le culot obtenu est plus concentré et plus riche en cellules et en spores par rapport à la centrifugation continue où il y'a beaucoup de pertes en cellules et en spores, ce qui explique les valeurs faibles obtenues en solides dans le 2000L.

L'estimation de la taille des particules est importante. Certaines particules à taille grossières ne sont pas accessibles pour les larves. Le biopesticide Foray, disponible sur le marché, montre une taille de particules très petite de l'ordre de 4,28 µm, convenable

pour atteindre les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Le bouillon du biopesticide Bioval présente des tailles de particules importantes dans les fermentations de 2000L et de 15L ( $-62 \pm 4,34 \mu\text{m}$ ), et 150L ( $67,2 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ). Cependant, la formulation présente un produit avec des tailles de particule relativement plus petites que dans le bouillon de fermentation. En effet, la centrifugation entraîne des chocs entre les floccs et permet l'obtention de produits à tailles réduites.

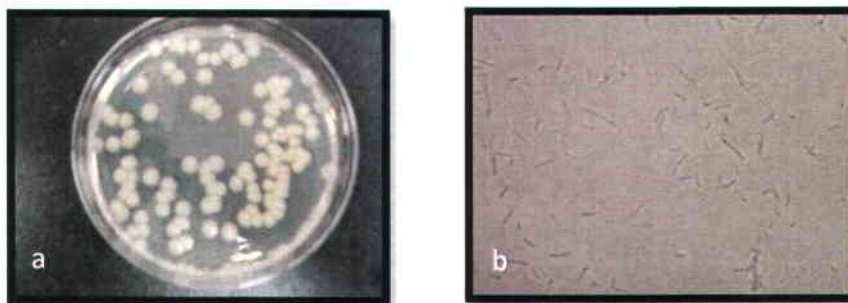
Les résultats obtenus pour le potentiel zêta montrent que la formulation a une bonne stabilité dans tous les fermenteurs : 2000L ( $-65,5 \pm 9,8 \text{ mV}$ ), 150L ( $-62,7 \pm 9,4 \text{ mV}$ ) et 15L ( $-61,3 \pm 9,2 \text{ mV}$ ), ce qui est largement supérieur à Foray qui possède néanmoins une bonne stabilité  $-31,8 \pm 4,8 \text{ mV}$ .

Une bonne viscosité est très importante pour une bonne qualité du biopesticide. La facilité à épandre le produit lors de l'application sur le terrain dépend de la viscosité. La viscosité du produit standard Foray ( $130 \pm 9,1 \text{ mPas}$ ) facilite l'épandage durant la pulvérisation sur le terrain. Les résultats obtenus en phase laboratoire dans le 15L ( $225,35 \pm 15,7 \text{ mPas}$ ) et 150L ( $240 \pm 16,8 \text{ mPas}$ ) montrent une viscosité élevée due aux solides totaux présents dans le culot obtenu après centrifugation, alors qu'en phase industrielle la centrifugation continue permet d'obtenir une viscosité moins élevée. En effet, la centrifugation continue permet d'obtenir un produit homogène; tel n'est pas le cas pour la centrifugation en batch. Les différents résultats obtenus montrent la possibilité de production d'un biopesticide efficace en phase industrielle.

#### **4.8 Résultats des problèmes rencontrés dans les fermenteurs**

Le bioréacteur de 150L de volume a permis de produire des résultats intéressants (Figure 13), après que beaucoup d'étapes furent revues et corrigées. Malheureusement, ceci ne fut pas le cas pour le bioréacteur de 2000L où, après 17 fermentations, 3 eurent du succès. Le reste fut contaminé par des souches microbiennes non déterminées. Les changements opérés sur le bioréacteur de 150L (Figure 14) ont permis les améliorations énumérées ci-après :





**Figure 13 : Bouillon fermenté après 48h de fermentation sans contamination microbienne : (a) boîte de Pétri (milieu Tryptic Soya Agar) et (b) vue microscopique.**

- Amélioration des processus de stérilisation

La stérilisation des fermenteurs a été améliorée avec l'apport de vapeur dans la cuve à vide pendant 20mn. Ensuite, une stérilisation à 124°C durant 20mn et une pasteurisation à 90°C pendant 15mn sont effectuées.

- Amélioration des processus d'inoculation du 150L

L'inoculation du 150L est réalisée à l'aide d'une fiole munie d'une ligne de transfert stérile.

- Amélioration des processus de transfert de l'inoculum vers le 2000L à partir du 150L

Avant de transférer l'inoculum obtenu à partir du 150L, une ligne de transfert stérile fut installée entre le 150L et le 2000L. La stérilisation de celle-ci fut optimisée. Elle devait être à une pression de 15psi sous vapeur pendant 30 minutes avant inoculation.

- Risque de pression négative dans le fermenteur

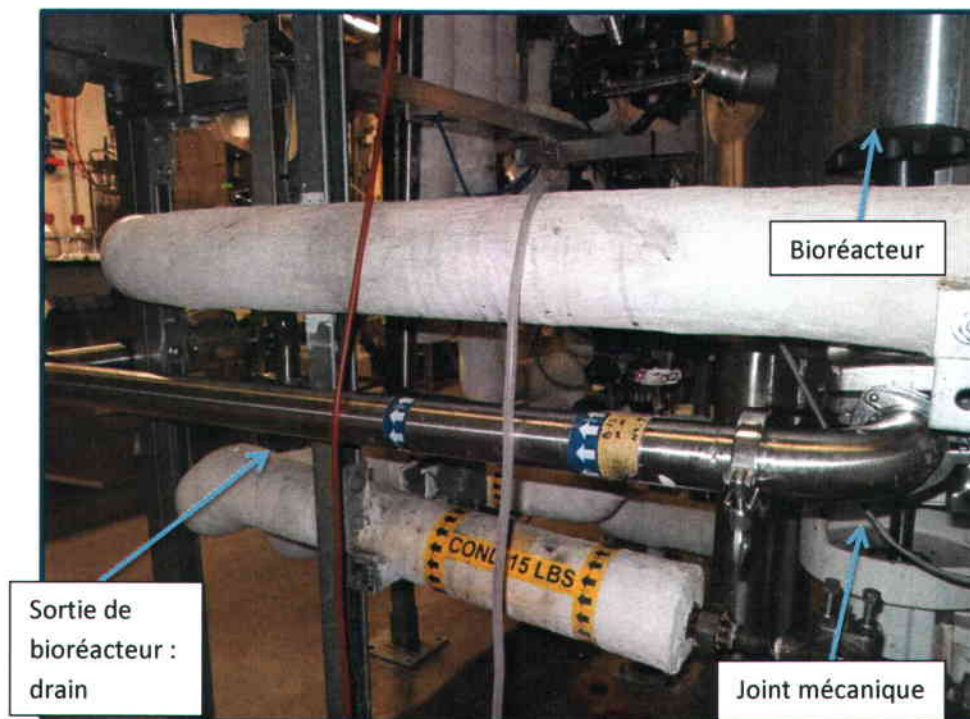
La pression négative dans le fermenteur entraîne une entrée d'air de l'extérieur du fermenteur vers l'enceinte de la cuve. Ce problème a été résolu en changeant l'évent (circuit reliant l'intérieur du fermenteur et l'extérieur du fermenteur) qui était trop long et communiquait avec l'entrée d'air. Le nouvel évent est composé de deux condenseurs (refroidis au glycol) et d'un filtre, ce qui assure une parfaite condensation et une pression positive.





**Figure 14 : Photos représentant les changements opérés sur le fermenteur de 150L (photos prises par Adama ndao, le 15-03-2014).**

- Risque de contamination par un retour des eaux provenant du drain. Le drain est constamment sous vapeur afin d'éviter tout retour des eaux (Figure 15).



**Figure 15 : Photo représentant la ligne reliant le fond du fermenteur au drain.  
(Photos prises par Adama Ndao, le 15-03-2014)**

Cependant, concernant le bioréacteur de 2000L, les mêmes efforts ont été consentis afin d'obtenir un produit qui remplit les qualités nécessaires avant épandage. Malheureusement, sur 17 fermentations, il n'y en a eu que 3 qui n'ont pas été contaminées. Les points suspectés et qui ont fait l'objet d'amélioration lors des opérations sont : (1) le brise-mousse fixé au sommet du bioréacteur qui permet de limiter une montée potentielle de mousse. Celui-ci n'était pas étanche après son activation et faisait communiquer l'extérieur de la cuve à l'intérieur; (2) les tests de pression qui se font, en remplissant d'eau le bioréacteur et en bouchant tous les orifices de celui-ci, ont montré que la pression d'air s'affaiblissait par l'intermédiaire du brise mousse. Finalement, il a été enlevé et remplacé par une plaque transparente, (3) le joint mécanique qui permet le fonctionnement de l'agitateur entraîne des fuites d'eau. En effet, l'étanchéité n'était pas assurée. Il fut remplacé et les fuites observées n'étaient plus présentes; (4) des experts de SNC Lavallin ont prouvé par des tests fluorescents, dans l'enceinte du fermenteur, que les boules de lavage qui permettent de nettoyer les parois du fermenteur manquaient certaines zones de celui-ci. Ce qui constitue un

problème majeur et dont la résolution constitue une nécessité pour l'obtention d'un produit performant.

## 5. CONCLUSION

Les performances atteintes avec les eaux usées issues de l'industrie de l'amidon pour la production du biopesticide Bioval, grâce au *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, en passant de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle, représentent une avancée importante. Par ailleurs, les eaux usées d'industries d'amidon représentent un problème d'ordre environnemental et réussir à les valoriser en tant que biopesticide, en alternative aux pesticides chimiques polluants, fut un beau défi relevé.

- 1) Les résultats obtenus en erlenmeyer sont plus favorables lorsque le milieu utilisé est le TSB en termes de sporulation (93%), de nombre de spores obtenues à 48h ( $2,30 \times 10^9$  CFU/ml) et d'entomotoxicité (21 200 UI/ml).
- 2) Dans le 15L, nous observons une prolongation de la phase exponentielle de croissance des cellules de 0h ( $1,17 \times 10^8$  CFU/ml) à 12h ( $2,9 \times 10^9$  CFU/ml) au lieu de 0h à 6h observé en erlenmeyer. Ceci favorise l'obtention d'un nombre plus élevés de spores ( $2,2 \times 10^9$ ) et donc de cristaux protéiques d'où les valeurs intéressantes d'entomotoxicité (23 400 UI/ml).
- 3) Le transfert d'oxygène est plus efficace en 2000L que dans le 150L et le 15L.
- 4) Les cellules et les spores en bouillon fermenté sont plus importantes en 2000L ( $0,71 \times 10^9 \pm 0,7 \times 10^8$ ,  $0,7 \times 10^9 \pm 0,7 \times 10^8$  UFC/ml) que dans le 150L ( $0,51 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^8$ ,  $0,41 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^8$  UFC/ml) et le 15L ( $0,41 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^8$ ,  $0,32 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^8$  UFC).
- 5) L'entomotoxicité obtenue après formulation est plus importante en 150L ( $24\,100 \pm 1205$  IU/UL) comparée aux 2000L ( $20\,200 \pm 1010$  IU/μL), au 15L ( $22\,400 \pm 1122$  IU/μL) et au Foray ( $20\,000 \pm 999$  IU/μL).
- 6) Le delta endotoxine est plus important en 2000L ( $382 \pm 38$  μg/ml) que dans le 150L ( $369 \pm 36$  μg/ml) et le 15L ( $333 \pm 33$  μg/ml).
- 7) Les solides totaux obtenus dans le Bioval sont plus importants après centrifugation dans le 150L ( $33,5 \pm 3,35$  g/L) que dans le 15L ( $27,6 \pm 2,76$  et 2000L ( $25,5 \pm 2,55$  g/L).
- 8) La viscosité obtenue dans le 2000L est de  $150 \pm 10,5$  mPas, tandis que celle des deux autres fermenteurs est de  $240 \pm 16,9$  mPas, pour le 150L, et de  $225 \pm 15$  mPas, pour le 15L.

- 9) La taille des particules est sensiblement égale pour les 3 fermenteurs : 2000L ( $17,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ), 150L ( $15,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ) et 15L ( $13,4 \pm 0,94 \mu\text{m}$ ) et plus importante que celle du Foray ( $4,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ).
- 10) Le taux de croissance maximal est sensiblement plus élevé dans le 2000L par rapport au 15L et au 150L.
- 11) Les problèmes de contamination ont été résolus pour le fermenteur de 150L.

Ces résultats permettent de produire industriellement à grande échelle un biopesticide à base de Btk nourrie à partir des eaux usées d'amidon.

## 6. RECOMMANDATIONS

Les prochaines recherches sur le projet Bt-INRS pourraient prendre en compte les recommandations suivantes :

- Il faudra définir et éliminer tous les problèmes dus à l'équipement et au design des bioréacteurs qui affectent de procédé de fermentation. C'est le point de départ sur la performance des prochaines recherches sur le biopesticide.
- Pour une implantation du projet Bt-INRS en industrie avec des capacités de production plus importante que 2000L par fermentation, il faudra déterminer la limite de transfert de l'inoculum en termes d'entomotoxicité, exprimée par la présence de cellules et de spores, de delta endotoxines et de synthèses des facteurs solubles.
- La perte en spores, en cellules, en cristaux protéiques et en produits solubles (protéases, vips), lors de la centrifugation, affecte l'entomotoxicité du biopesticide. Une option serait d'optimiser le processus en aval de la fermentation par la floculation des résidus actifs issus de la fermentation de Btk.
- La perte en cellules, en spores et en cristaux protéiques cause un réel problème quant à l'efficacité du processus en amont de la formulation. L'optimisation de la centrifugeuse continue à travers la production de la crème en vue de la formulation liquide devra être revue et corrigée pour une meilleure efficacité.
- Afin d'augmenter la gamme des produits issus du projet Bt-INRS et afin d'augmenter la valeur ajoutée du biopesticide, les formulations sèches comme les poudres doivent être étudiées.
- Des études doivent être effectuées afin de comprendre l'action synergique des facteurs de virulence tels que les protéines insecticides végétatives (vips).

## 7. RÉFÉRENCES

- Abdel-Hameed, A. (2001). Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 857-861.
- Ackermann, H.W.; Azizbekyan, R.R.; Bernier, R.L.; de Barjac, H.; Saindoux, S.; Valéro, J.R.; Yu, M.X. Phage typing of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*. 1995 Research in Microbiology 146: 643-657.
- Agaisse H. and Lereclus D. (1995) How Does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.*, 177: 6027-6032.
- Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O. A., Kolstø, A.-B. and Lereclus, D. (1999), PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 32: 1043–1053. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x
- Ahmad, M. N., Holland, C. R., & McKay, G. (1994). Mass transfer studies in batch fermentation: Mixing characteristics. *Journal of food engineering*, 23(2), 145-158.
- Al Masry, W. A. (1999). Effect of liquid volume in the gas separator on the hydrodynamics of airlift reactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(10), 931-936.
- Andrews, R. E., Bibilos, M. M., & Bulla, L. A. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), 737-742.
- Annachhatre, A. P., & Amatya, P. L. (2000). UASB treatment of tapioca starch wastewater. *Journal of environmental engineering*, 126(12), 1149-1152.
- APHA, AWWA et WPCF (éds). 1989. Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 17<sup>e</sup>d edition. American Public Health Association, Washington, Etats-Unis.
- Arcas, J., Yantorno, O., & Ertola, R. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology letters*, 9(2), 105-110.
- Arnold, B. H., & Steel, R. (1958). Oxygen supply and demand in aerobic fermentations. *Biochemical engineering*, 149.
- Aronson, A. I., & Beckman, W. I. L. L. I. A. M. (1987). Transfer of chromosomal genes and plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*, 53(7), 1525-1530.
- Aronson, A. I., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews*, 50(1), 1.
- Aronson, A. I., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 195(1), 1-8.
- Aronson, A. (2002). Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 417-425.

- Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R. and Bhatnagar, R.K. (2003) A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 620–625.
- Avignone-Rossa, C., Arcas, J., & Mignone, C. (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(3), 301-304.
- Bailey, J.E., and D.F. Olis, *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, Inc., New York (1986).
- Barboza-Corona, J. E., Contreras, J. C., Velázquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gómez-Ramírez, M., Cruz-Camarillo, R., & Ibarra, J. E. (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 21(12), 1125-1129.
- Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernandez, R., Bautista, M., Jiménez, B., & Ibarra, J. E. (2003). Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 1023-1029.
- Barnabé, S., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Beauchesne, I., & Surampalli, R. Y. (2009). Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products—Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the total environment*, 407(5), 1471-1488.
- Bechtel, D. B., & Bulla, L. A. (1976). Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*, 127(3), 1472-1481.
- Beegle, C. C. (1990). Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z. E., Sinai, R., Manasherob, R., ... & Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4883-4890.
- Bernhard, K., & Utz, R. (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. *Bacillus thuringiensis*, 255-267.
- Bond, R. P. M., Boyce, C. B. C., & French, S. J. (1969). A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Biochem. J*, 114, 477-488.
- Bonnefoi, A., & de Barjac, H. (1963). Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. *Entomophaga*, 8(3), 223-229.
- Boychyn, M., Doyle, W., Bulmer, M., More, J., & Hoare, M. (2000). Laboratory scaledown of protein purification processes involving fractional precipitation and centrifugal recovery. *Biotechnology and bioengineering*, 69(1), 1-10.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2005). Starch industry wastewater-based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of economic entomology*, 98(6), 1890-1898.



- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Screening of different adjuvants for wastewater/wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulations. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1065-1079.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water research*, 40(6), 1310-1320.
- Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International journal of medical microbiology*, 291(2), 67-79.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Broderick, N. A., Goodman, R. M., Raffa, K. F., & Handelsman, J. O. (2000). Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental entomology*, 29(1), 101-107.
- Broderick, N. A., Goodman, R. M., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2003). Effect of host diet and insect source on synergy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by zwittermicin A. *Environmental entomology*, 32(2), 387-391.
- Bulla Jr, L. A., Rhodes, R. A., & St. Julian, G. (1975). Bacteria as insect pathogens. *Annual Reviews in Microbiology*, 29(1), 163-190.
- Burges, H.D. (ed.) 1998. *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Organisms, nematodes and seed treatments*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Campbell, D. P., Dieball, D. E., & Brackett, J. M. (1987). Rapid HPLC assay for the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 156-158.
- Carroll, B. (2001). Selecting the right adjuvant. *Helena Chemical Company's Guide to Adjuvants*.
- Carroll, J., Li, J., & Ellar, D. J. (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J*, 261, 99-105.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Détermination des solides totaux et des solides totaux volatils : Méthode gravimétrique. Ministère de l'environnement du Québec, MA.100-S.T. 1.0, 2005, 12p.
- Chestukhina, G. G., Zalunin, I. A., Kostina, L. I., Kotova, T. S., Kattrukha, S. P., & Stepanov, V. M. (1980). Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. The limited hydrolysis by endogeneous proteinases as a cause of their apparent multiplicity. *Biochem. J*, 187, 457-465.
- Christenson, H. K. (1984). DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) theory and solvation forces between mica surfaces in polar and hydrogen-bonding liquids. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 80(7), 1933-1946.

D.A.H. Hanaor, M. Michelazzi, C. Leonelli, C.C. Sorrell; The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>. Journal of the European Ceramic Society vol. 32(1) 235-244, 2012.

DALHAMMAR, G., & STEINER, H. (1984). Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. European Journal of Biochemistry, 139(2), 247-252.

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

Donovan, W. P., Donovan, J. C., & Engleman, J. T. (2001). Gene Knockout Demonstrates That *vip3A* Contributes to the Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. Journal of Invertebrate Pathology, 78(1), 45-51.

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

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

Dulmage, H. T., Yousten, A. A., Singer, S., & Lacey, L. A. (1990). Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*/editors, HT Dulmage...[et al.].

Dulmage H.T., Aizawa K., (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. Microbial (tl and Viral Pesticides, é d.) : Kurstak, E., pp. 209-237

Dulmage, H. T., Correa, J. A., & Martinez, A. J. (1970). Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. Journal of invertebrate pathology, 15(1), 15-20.

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

Edlund, T., Sidén, I., & Boman, H. G. (1976). Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. Infection and immunity, 14(4), 934-941.

Espinasse, S., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Gohar, M., Bourguet, D., & Sanchis, V. (2003). Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. Current microbiology, 47(6), 501-507.

Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5389–5394

Farrera F., Perez-Guevara F., and de la Torre M. (1998). Carbon: nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. Applied Microbiology and Biotechnology, 49: 758-765.

- Fedhila, S., Nel, P., & Lereclus, D. (2002). The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *Journal of bacteriology*, 184(12), 3296-3304.
- Ferry, N., Edwards, M. G., Gatehouse, J. A., & Gatehouse, A. M. (2004). Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(2), 155-161.
- Ferro, D. N., Slocombe, A. C., & Mercier, C. T. (1997). Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): residual mortality and artificial weathering of formulated *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis. *Journal of economic entomology*, 90(2), 574-582.
- Flores, E. R., Pérez, F., & de la Torre, M. (1997). Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of fermentation and bioengineering*, 83(6), 561-564.
- Foda, M. S., Salama, H. S., & Selim, M. (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 22(1), 50-52.
- Fyferling, M. (2007). Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive (Doctoral dissertation, Université de Nantes).
- Glare, T. R., & O'Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety (Vol. 350). Chichester: Wiley.
- Gulati, R., Saxena, R. K., & Gupta, R. (2000). Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. *Process Biochemistry*, 36(1), 149-155.
- Greenwood, R., & Kendall, K. (1999). Selection of suitable dispersants for aqueous suspensions of zirconia and titania powders using acoustophoresis. *Journal of the European Ceramic Society*, 19(4), 479-488.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *Journal of molecular biology*, 254(3), 447-464.
- HAIDER, M. Z., KNOWLES, B. H., & ELLAR, D. J. (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. colmeri insecticidal  $\delta$ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry*, 156(3), 531-540.
- Hansen, B. M., Damgaard, P. H., Eilenberg, J., & Pedersen, J. C. (1998). Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects. *Journal of invertebrate pathology*, 71(2), 106-114.
- Hatfaludi, T., Liska, M., Zellinger, D., Ousman, J. P., Szostak, M., árpád Ambrus, & Lubitz, W. (2004). Bacterial ghost technology for pesticide delivery. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(18), 5627-5634.
- Höfte, H., & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological reviews*, 53(2), 242-255.
- Humphery A (1998) Shake Flask to Fermentor: What have we Learned. *Biotechnol Prog* 14: 3-7.

Jarvis, P. 2001. Biopesticides: trends and opportunities, Agrow Reports, PJB Publications ([www.pjbpubs.com/agrow](http://www.pjbpubs.com/agrow)).

Johnson, D. E., & McGaughey, W. H. (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current microbiology*, 33(1), 54-59.

Jong, J. Z., Wu, W. T., & Tzeng, Y. M. (1994). pH control for fed-batch culture of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology techniques*, 8(7), 483-486.

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

Jurat-Fuentes, J. L. and Adang, M. J. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271: 3127–3135. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x

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

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

K. D. Adjalle, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, J. R. Valero, and R. Y. Surampalli, "Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *B. thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 9, pp. 1302–1311, 2007.

Kang B.C., Lee S.Y., and Chang H.N. (1992) Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed batch culture. *Biotechnology Letters*, 14: 721-726.

Käppeli, O., & Fiechter, A. (1981). On the methodology of oxygen transfer coefficient measurements. *Biotechnology Letters*, 3(10), 541-546.

Khanh Dang Vu, R. D. Tyagi, S. K. Brar, J. R. Valero, R. Y. Surampalli. (2009) Starch industry wastewater for production of biopesticides - ramifications of solids concentrations. *Environmental Technology* 30:4, 393-405.

Khuzhamshukurov, N. A., Yusupov, T. Y., Khalilov, I. M., Guzalova, A. G., Muradov, M. M., & Davranov, K. D. (2001). The Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(6), 596-598.

Kunitate, A., OKAMOTO, M., & OHMORI, I. (1989). Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agricultural and biological chemistry*, 53(12), 3251-3256.

Kroiss, H. (2004). What is the potential for utilizing the resources in sludge?. *Water Science & Technology*, 49(10), 1-10.

Lachhab, K., Tyagi, R. D., & Valero, J. R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37(2), 197-208.

Langley, J., & Symes, K. C. (1998). U.S. Patent No. 5,744,152. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- LeBlanc, Marie-Eve (2003). *Effets des différentes stratégies et prétraitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Mémoire. Québec, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, 165 p.
- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T., & Lee, J. K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3919-3924.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., and Chen, J. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4648–4657.
- Lertcanawanichakul, M., & Wiwat, C. (2000). Improved shuttle vector for expression of chitinase gene in *Bacillus thuringiensis*. *Letters in applied microbiology*, 31(2), 123-128.
- Li, E., & Yousten, A. A. (1975). Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology*, 30(3), 354-361.
- Lin, Y., & Xiong, G. (2004). Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar alesti. *Biotechnology letters*, 26(8), 635-639.
- Lindquist, D. A. Les pesticides: la chimie au service de la survie.
- Li, J., Koni, P. A., & Ellar, D. J. (1996). Structure of the Mosquitocidal  $\delta$ -Endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and Implications for Membrane Pore Formation. *Journal of molecular biology*, 257(1), 129-152.
- L. F. A. ALVES, S. B. ALVES, R. M. PEREIRA & D. M. F. CAPALBO (1997): Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. kurstaki Grown in Alternative Media, *Biocontrol Science and Technology*, 7:3, 377-384.
- Lisansky, S. G., Quinlan, R., & Tassoni, G. (1993). *Bacillus thuringiensis* production handbook: laboratory methods, manufacturing, formulation, quality control, registration. CPL Scientific Ltd.
- Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 68(1), 11-17.
- Liu, W. M., & Bajpai, R. K. (1995). A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology progress*, 11(5), 589-591.
- Li R.S., Jarrett P. and Burges H.D. (1987) Importance of spores, crystals, and  $\delta$ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J Invertebr Pathol* 50, 277-284.
- Lövgren, A., Zhang, M., Engström, A., Dalhammar, G., & Landen, R. (1990). Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology*, 4(12), 2137-2146.
- MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Sims, S. R., Hunst, P. L., Greenplate, J. T., Marrone, P. G. & Fuchs, R. L. (1990). Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(2), 258-266.
- Maldonado, B. M., Galán, W. L., Rodríguez, P. C., & Quiroz, M. H. (2002). Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval

- Aedes aegypti* in the laboratory. Journal of the American Mosquito Control Association, 18(4), 352-358.
- Malladi, B., & Ingham, S. C. (1993). Thermophilic aerobic treatment of potato-processing wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(1), 45-49.
- Manker DC, Lidster WD, Starnes RL, MacIntosh SC (1994) Potentiator of *Bacillus* pesticidal activity. Patent Coop Treaty WO94/09630
- McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229(4709), 193-195.
- Milne, R., Liu, Y., Gauthier, D., & van Frankenhuyzen, K. (2008). Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*)(Lepidoptera). *Journal of invertebrate pathology*, 99(2), 166-172.
- Mittal, P. K. (2003). Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. *Journal of vector borne diseases*, 40(1/2), 20.
- Mohammedi, S., Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. *Process Biochemistry*, 41(4), 829-835.
- Motarjemi, M., & Jameson, G. J. (1978). Mass transfer from very small bubbles—the optimum bubble size for aeration. *Chemical Engineering Science*, 33(11), 1415-1423.
- Morris, O. N. (1983). Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation by sunlight. *The Canadian Entomologist*, 115(09), 1215-1227.
- Nair, J. R., Narasimman, G., & Sekar, V. (2004). Cloning and partial characterization of zwittermixin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 495-503.
- Navon, A., Keren, S., Levski, S., Grinstein, A., & Riven, Y. (1997). Granular feeding baits based on *Bacillus thuringiensis* products for the control of lepidopterous pests. *Phytoparasitica*, 25(1), S101-S110.
- Nickerson, K. W., & Bulla, L. A. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology*, 28(1), 124-128.
- Navon, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. *Crop protection* 19: 669-676.
- Ogiwara, K., Indrasith, L. S., Asano, S., & Hori, H. (1992). Processing of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *Journal of invertebrate pathology*, 60(2), 121-126.
- Özbek, B., & Gayik, S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 36(8), 729-741.
- Ozergin- Ulgen, K., & Mavituna, F. (1998). Oxygen transfer and uptake in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) culture in a batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73(3), 243-250.
- Pearson D, Ward OP (1988) Effect of culture conditions on growth and sporulation of

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

Perani, M., & Bishop, A. H. (1999). Effects of media composition of delta-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. *Microbios*, 101(398), 47-66.

Pramuk Parakulsuksatid, (2000). Utilization of microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot scale baker's yeast fermentation unit, Master Science, Faculty of the virginia, USA.

Porcar, M. and Juárez-Pérez, V. (2003), PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 419-432. doi: 10.1111/j.1574-6976.2003.tb00624.x.

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

Rajbhandari, B. K., & Annachhatre, A. P. (2004). Anaerobic ponds treatment of starch wastewater: case study in Thailand. *Bioresource technology*, 95(2), 135-143.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., ... & Zilberstein, A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581-3586.

Rhodes, D. J. (1993). Formulation of biological control agents. In *Exploitation of microorganisms* (pp. 411-439). Springer Netherlands.

Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vázquez, R., & Ibarra, J. E. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 299-308.

Rowe, G. E., & Margaritis, A. (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD- 1 kurstaki. *Biotechnology and bioengineering*, 86(4), 377-388.

Rushton, J. H., & Oldshue, J. Y. (1953). *Mixing Present Theory and Practice*. *Chemical Engineering Progress*, 49(4), 161-168.

Sachdeva, V., Tyagi, R.D., and Valéro, J.R. (2000). "Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal". *Water Sci. Technol.*, 42(9), 211-216.

Salama, H. S., Foda, M. S., Dulmage, H. T., & El-Sharaby, A. (1983). Novel fermentation media for production of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(1), 8-19.

Salama, H. S., Sharaby, A., & Magd El-Din, M. (1993). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 14(04), 537-543.

Salamitou, S., Ramisse, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., ... & Lereclus, D. (2000). The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of

- Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology*, 146(11), 2825-2832.
- Scherrer P., Luthy P., and Trumpi P. (1973) Production of  $\delta$ -Endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a Function of Glucose Concentrations. *Applied Microbiology*, 25: 644-646.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.
- Schesser, J. H., & Bulla, L. A. (1978). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spores to the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Applied and environmental microbiology*, 35(1), 121-123.
- Scholkopf, B., Sung, K. K., Burges, C. J., Girosi, F., Niyogi, P., Poggio, T., & Vapnik, V. (1997). Comparing support vector machines with Gaussian kernels to radial basis function classifiers. *Signal Processing, IEEE Transactions on*, 45(11), 2758-2765.
- Selvapandian, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S. K., Venkatesan, T., Singh, S. P., and Bhatnagar, R. K. (2001) Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5855–5858.
- Siden, I., Dalhammar, G., Telander, B., Boman, H. G., & Somerville, H. (1979). Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*: purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *Journal of general microbiology*, 114(1), 45-52.
- Siegel J.P. (2001) The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77 : 13-21.
- Silo-Suh, L. A., Stabb, E. V., Raffel, S. J., & Handelsman, J. (1998). Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current microbiology*, 37(1), 6-11.
- Sirichotpakorn, N., Rongnoparut, P., Choosang, K., & Panbangred, W. (2001). Coexpression of Chitinase and the *cry11Aa1* Toxin Genes in *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelensis*. *Journal of invertebrate pathology*, 78(3), 160-169.
- Smirnoff, W. A., & Valero, J. R. (1979). MODE D'ACTION DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CHEZ *CHORISTONEURA FUMIFERANA* (LEPIDOPTERA-TORTRICIDAE): IMPORTANCE DES SPORES. *The Canadian Entomologist*, 111(03), 305-308.
- Smith, R. A., & Couche, G. A. (1991). The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 311-315.
- Song, Y., Yang, R., Guo, Z., Zhang, M., Wang, X., & Zhou, F. (2000). Distinctness of spore and vegetative cellular fatty acid profiles of some aerobic endospore-forming bacilli. *Journal of microbiological methods*, 39(3), 225-241.
- Stabb, E. V., Jacobson, L. M., & Handelsman, J. (1994). Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and environmental microbiology*, 60(12), 4404-4412.
- Stohl, E. A., Milner, J. L., & Handelsman, J. (1999). Zwittermicin A biosynthetic cluster. *Gene*, 237(2), 403-411.



- Sundara Babu, P. C., & Ananda Krishnan, K. B. (1970). Preliminary studies on the effect of 'Thuricide' for the control of the semilooper, *Achaea janata*, on the castor bean plant, *Ricinus communis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15(1), 129-130.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S., & Galn Wong, L. J. (2000). Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of economic entomology*, 93(2), 219-225.
- Tamez-Guerra, P., MCGUIRE, M. R., Medrano-Roldan, H., Galan-Wong, L. J., Shasha, B. S., & Vega, F. E. (1996). Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *Journal of economic entomology*, 89(6), 1424-1430.
- Tan, Y., & Donovan, W. P. (2000). Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of biotechnology*, 84(1), 67-72.
- Tantimavanich, S., Pantuwatana, S., Bhumiratana, A., & Panbangred, W. (1997). Cloning of a chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. *The Journal of general and applied microbiology*, 43(6), 341-347.
- Thamthiankul, S., Moar, W. J., Miller, M. E., & Panbangred, W. (2004). Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(2), 183-192.
- Tojo, A. (1986). Mode of action of bipyrimal  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. *Applied and environmental microbiology*, 51(3), 630-633.
- Toreki, W., Manukian, A., & Strohschein, R. (2004). U.S. Patent No. 6,780,507. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Tyagi, R., Barnabe, S., Vidyarthi, A., Valro, J., & Surampalli, R. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science & Technology*, 46(10), 247-254.
- Valero, J. R., Mohammedi, S., Payne, N. J., & Tyagi, R. D. (1999). Microbial control of defoliating forest insects.
- Van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R., & Masson, L. (1991). Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera. *Applied and environmental microbiology*, 57(6), 1650-1655.
- VERMA, Ruchi; NIGAM, Vinod Kumar; KUNDU, Subir and GHOSH, Purnendu. Morphological differentiation and effect of seed inoculum on the production of CPC by *Acremonium chrysogenum*. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 2006, vol. 20, no. 2, p. 275-280.
- Vidyarthi, A., Tyagi, R., & Valro, J. (2001). Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science & Technology*, 44(10), 253-259.
- Vilas-Bôas, G. T., & Lemos, M. V. F. (2004). Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian journal of microbiology*, 50(8), 605-613.

- Vu K.D., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2008) Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng.* DOI 10.1007/s00449-008-0271-z. (online)
- VU.K.D. (2009). Développement de stratégies pour la production d'un biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1 avec une forte activité insecticide en utilisant les eaux usées d'industrie d'amidon comme matière première.
- Pollack, W., & Reckel, R. P. (1977). A reappraisal of the forces involved in hemagglutination. *International Archives of Allergy and Immunology*, 54(1), 29-42.
- Widner, W. R., & Whiteley, H. R. (1989). Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *Journal of Bacteriology*, 171(2), 965-974.
- Wiwat, C., Thaithanun, S., Pantuwatana, S., & Bhumiratana, A. (2000). Toxicity of Chitinase-Producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *Journal of invertebrate pathology*, 76(4), 270-277.
- Whalon, M. E. and Wingerd, B. A. (2003), Bt: Mode of action and use . *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54: 200–211. doi: 10.1002/arch.10117
- Whiteley, H. R., Schnepf, H. E., Tomczak, K., & Lara, J. C. (1987). Structure and regulation of the crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*, 13-27.
- Yezza, A. (2005). *Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de Bacillus thuringiensis utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation*. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y., & Smith, J. (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 545-552.
- Yezza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource technology*, 97(15), 1850-1857.
- Yezza, A., Tyagi, R. D., Valero, J. R., & Surampalli, R. Y. (2006). Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge. *Process biochemistry*, 41(4), 794-800.
- Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G., & Estruch, J. J. (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 532-536.
- Zamola, B., Valles, P., Meli, G., Miccoli, P., & Kajfež, F. (1981). Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 1079-1086.
- Zhong, W. F., Fang, J. C., Cai, P. Z., Yan, W. Z., Wu, J., & Guo, H. F. (2005). Cloning of the *Bacillus thuringiensis* serovar sotto chitinase (Schi) gene and characterization of its protein. *Genetics and Molecular Biology*, 28(4), 821-826.

Zouari N., Achour O., Jaoua S., (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm fermenters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 77 : 877-882

Zouari, N., & Jaoua, S. (1999). The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 497-502.

**Annexe1 : Concentration en mmol/l.h de l'OTR, l'OUR et le  $K_L$  dans les fermenteurs de 2000L, 150L et de 15L (Figure 10 pages 45)**

| Temps (h) | $K_L$ |       |       | OUR   |       |       | OTR   |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L |
| 0         | 48,03 | 41,81 | 59,68 | 0,103 | 0,147 | 0,059 | 0,392 | 1,274 | 1,232 |
| 6         | 67,18 | 73,22 | 89,18 | 0,138 | 0,208 | 0,232 | 1,060 | 1,632 | 1,706 |
| 12        | 54,67 | 44,7  | 61,21 | 0,052 | 0,105 | 0,125 | 0,619 | 1,160 | 1,311 |
| 18        | 56,93 | 66,49 | 84,07 | 0,089 | 0,140 | 0,175 | 1,015 | 1,398 | 1,495 |
| 24        | 51,40 | 51,88 | 56,81 | 0,051 | 0,109 | 0,110 | 0,662 | 1,153 | 1,406 |
| 30        | 44,69 | 50,80 | 64,14 | 0,046 | 0,107 | 0,108 | 0,650 | 1,138 | 1,421 |
| 36        | 45,28 | 46,99 | 55,74 | 0,048 | 0,101 | 0,103 | 0,663 | 1,148 | 1,254 |
| 42        | 45,18 | 43,91 | 62,46 | 0,042 | 0,078 | 0,105 | 0,660 | 1,148 | 1,203 |
| 48        | 48,03 | 41,81 | 59,68 | 0,103 | 0,147 | 0,059 | 0,392 | 1,274 | 1,232 |

| Temps (h) | $K_L$ |       |       | OUR   |       |       | OTR   |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L |
| 0         | 49,3  | 42,91 | 60,98 | 0,105 | 0,150 | 0,065 | 0,395 | 1,277 | 1,235 |
| 6         | 68,31 | 74,52 | 90,40 | 0,139 | 0,301 | 0,237 | 1,064 | 1,635 | 1,709 |
| 12        | 56,09 | 45,28 | 62,55 | 0,054 | 0,108 | 0,129 | 0,623 | 1,165 | 1,314 |
| 18        | 57,14 | 67,59 | 85,65 | 0,092 | 0,143 | 0,179 | 1,017 | 1,341 | 1,499 |
| 24        | 52,89 | 52,59 | 57,37 | 0,053 | 0,113 | 0,113 | 0,668 | 1,155 | 1,409 |
| 30        | 44,09 | 51,20 | 65,19 | 0,048 | 0,110 | 0,112 | 0,653 | 1,134 | 1,425 |
| 36        | 46,90 | 47,56 | 56,04 | 0,051 | 0,103 | 0,114 | 0,667 | 1,151 | 1,257 |
| 42        | 47,01 | 44,89 | 63,75 | 0,044 | 0,080 | 0,109 | 0,667 | 1,150 | 1,206 |
| 48        | 48,93 | 42,49 | 60,41 | 0,105 | 0,150 | 0,063 | 0,400 | 1,276 | 1,237 |

| Temps (h) | $K_L$ |       |       | OUR   |       |       | OTR   |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L | 15L   | 150L  | 2000L |
| 0         | 47,10 | 40,09 | 58,29 | 0,09  | 0,146 | 0,057 | 0,390 | 1,270 | 1,230 |
| 6         | 66,09 | 72,85 | 88,34 | 0,110 | 0,207 | 0,228 | 1,057 | 1,629 | 1,703 |
| 12        | 55,36 | 43,30 | 60,12 | 0,043 | 0,104 | 0,123 | 0,615 | 1,159 | 1,309 |
| 18        | 54,67 | 65,28 | 83,09 | 0,078 | 0,137 | 0,173 | 1,012 | 1,395 | 1,493 |
| 24        | 50,29 | 50,53 | 55,76 | 0,046 | 0,105 | 0,097 | 0,659 | 1,150 | 1,404 |
| 30        | 43,50 | 49,25 | 63,21 | 0,035 | 0,104 | 0,104 | 0,647 | 1,135 | 1,418 |
| 36        | 44,10 | 45,20 | 54,23 | 0,039 | 0,989 | 0,101 | 0,660 | 1,145 | 1,250 |
| 42        | 44,07 | 42,31 | 61,54 | 0,035 | 0,075 | 0,103 | 0,657 | 1,145 | 1,200 |
| 48        | 47,01 | 40,65 | 58,31 | 0,985 | 0,145 | 0,058 | 0,389 | 1,270 | 1,228 |

**Annexe 2 : Concentration des cellules totales, spores viables (Figure 11 page 47)**

| Temps (h) | Spores (CFU/ml) |          |          | Cellules (CFU/ml) |          |          |
|-----------|-----------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|
|           | 15L             | 150L     | 2000L    | 15L               | 150L     | 2000L    |
| 0         | 0               | 0,00E+00 | 0        | 1,75E+07          | 2,10E+07 | 1,33E+07 |
| 6         | 0               | 0,00E+00 | 0        | 2,21E+08          | 2,55E+08 | 1,02E+08 |
| 12        | 0               | 0,00E+00 | 0,00E+00 | 4,25E+08          | 5,35E+08 | 6,50E+08 |
| 18        | 2,58E+08        | 1,64E+08 | 3,30E+08 | 4,20E+08          | 5,23E+08 | 6,30E+08 |
| 24        | 3,27E+08        | 4,50E+08 | 5,50E+08 | 4,17E+08          | 5,23E+08 | 6,00E+08 |
| 30        | 3,22E+08        | 4,30E+08 | 5,30E+08 | 4,16E+08          | 5,17E+08 | 5,80E+08 |
| 36        | 3,22E+08        | 4,30E+08 | 5,00E+08 | 4,14E+08          | 5,17E+08 | 5,70E+08 |
| 42        | 3,21E+08        | 4,25E+08 | 5,00E+08 | 4,13E+08          | 5,16E+08 | 5,50E+08 |
| 48        | 3,19E+08        | 4,20E+08 | 5,10E+08 | 4,09E+08          | 5,13E+08 | 5,60E+08 |

| Temps (h) | Spores (CFU/ml) |          |          | Cellules (CFU/ml) |          |           |
|-----------|-----------------|----------|----------|-------------------|----------|-----------|
|           | 15L             | 150L     | 2000L    | 15L               | 150L     | 2000L     |
| 0         | 0               | 0        | 0        | 3,50E+07          | 4,20E+07 | 2,00E+07  |
| 6         | 0               | 0        | 0        | 3,98E+08          | 4,60E+08 | 2,8E+08   |
| 12        | 0               | 0,00E+00 | 0,00E+00 | 4,00E+08          | 5,20E+08 | 6,5E+08   |
| 18        | 3,15E+08        | 7,70E+07 | 3,22E+08 | 3,95E+08          | 5,15E+08 | 6,2 E +08 |
| 24        | 3,23E+08        | 4,60E+08 | 5,42E+08 | 3,93E+08          | 5,15E+08 | 6,2 E +08 |
| 30        | 3,19E+08        | 4,40E+08 | 5,25E+08 | 3,93E+08          | 5,14E+08 | 6,01 E 08 |
| 36        | 3,18E+08        | 4,50E+08 | 4,97E+08 | 3,92E+08          | 5,14E+08 | 6,01E+08  |
| 42        | 3,18E+08        | 4,40E+08 | 4,97E+08 | 3,90E+08          | 5,13E+08 | 6,01E+08  |
| 48        | 3,16E+08        | 4,30E+08 | 4,99E+08 | 3,88E+08          | 5,10E+08 | 6,01E+08  |

| Temps (h) | Spores (CFU/ml) |          |          | Cellules (CFU/ml) |          |           |
|-----------|-----------------|----------|----------|-------------------|----------|-----------|
|           | 15L             | 150L     | 2000L    | 15L               | 150L     | 2000L     |
| 0         | 0               | 0        | 0        | 1,00E+07          | 1,10E+07 | 1,15E+07  |
| 6         | 0               | 0        | 0        | 1,25E+08          | 1,30E+08 | 1,16E+08  |
| 12        | 0               | 0,00E+00 | 0,00E+00 | 3,98E+08          | 5,25E+08 | 6,1E+08   |
| 18        | 0,57E+08        | 0,87E+08 | 3,29E+08 | 3,98E+08          | 5,19E+08 | 6,2 E +08 |
| 24        | 0,04E+08        | 4,55E+08 | 5,48E+08 | 3,98E+08          | 5,19E+08 | 6,2 E +08 |
| 30        | 0,03E+08        | 4,35E+08 | 5,28E+08 | 3,98E+08          | 5,19E+08 | 6,0 E 08  |
| 36        | 0,04E+08        | 4,35E+08 | 4,98E+08 | 3,99E+08          | 5,19E+08 | 5,9 E+08  |
| 42        | 0,03E+08        | 4,35E+08 | 4,98E+08 | 3,99E+08          | 5,15E+08 | 5,8 E+08  |
| 48        | 0,03E+08        | 4,25E+08 | 5,00E+08 | 3,90E+08          | 5,15E+08 | 5,7 E+08  |

**Annexe 3 : Concentration delta endotoxine (ug/ml) dans les fermenteurs de 2000L, 150L et 15L (Figure 12 page 50)**

| Temps (h) | Concentration (ug/ml) |        |        |
|-----------|-----------------------|--------|--------|
|           | 15L                   | 150L   | 2000L  |
| 0         | 67,21                 | 6,11   | 9,23   |
| 6         | 111,29                | 8,6    | 40,56  |
| 12        | 248,85                | 302,73 | 280,24 |
| 18        | 269,78                | 315,55 | 329,72 |
| 24        | 230,25                | 327,82 | 286,46 |
| 30        | 280,76                | 348    | 328,5  |
| 36        | 269,92                | 346,02 | 330,14 |
| 42        | 257,40                | 346,85 | 356,67 |
| 48        | 333,43                | 368,22 | 381,72 |

| Temps (h) | Concentration (ug/ml) |        |        |
|-----------|-----------------------|--------|--------|
|           | 15L                   | 150L   | 2000L  |
| 0         | 69,4                  | 8,34   | 11,32  |
| 6         | 113,32                | 10,23  | 42,65  |
| 12        | 251,78                | 305    | 283,24 |
| 18        | 271,73                | 318    | 331,2  |
| 24        | 233,20                | 329    | 289,23 |
| 30        | 283,79                | 351,42 | 330,51 |
| 36        | 271,12                | 348,32 | 333,56 |
| 42        | 260,1                 | 348,09 | 359,56 |
| 48        | 336,32                | 371    | 383,65 |

| Temps (h) | Concentration (ug/ml) |        |        |
|-----------|-----------------------|--------|--------|
|           | 15L                   | 150L   | 2000L  |
| 0         | 65,09                 | 4,11   | 7,21   |
| 6         | 108,43                | 5,6    | 38,45  |
| 12        | 245,76                | 302,56 | 278,21 |
| 18        | 267,98                | 313,32 | 327,76 |
| 24        | 228,24                | 325,67 | 284,43 |
| 30        | 276,54                | 345,89 | 325,66 |
| 36        | 265,32                | 344,43 | 327,78 |
| 42        | 255,1                 | 343,21 | 353,22 |
| 48        | 330,43                | 365,56 | 379,98 |

## Méthode de calcul du $K_{La}$ , OTR, OUR dans les fermenteurs

## Méthode de calcul du $K_{La}$ , OTR, OUR dans les fermenteurs

| 6h      |        | 12h     |        | 18h     |        | 24h     |        | 30h     |        | 36h     |        | 42h     |        | 48h     |        |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on | Air off | Air on |
| 42      | 30     | 78.7    | 30.1   | 92.5    | 64.7   | 95.2    | 80.1   | 72.9    | 52.7   | 77.5    | 61.5   | 94.1    | 83.9   | 93.8    | 83.1   |
| 41.2    | 30.2   | 76.8    | 39.7   | 92.2    | 68.9   | 95      | 82.9   | 72.8    | 54     | 77.4    | 62.7   | 94      | 84     | 93.5    | 83.8   |
| 38.5    | 32.6   | 74      | 46.2   | 91      | 72.9   | 93.8    | 85.1   | 72.1    | 55.3   | 76.9    | 63.8   | 93.7    | 85     | 93      | 84.6   |
| 33.8    | 33.8   | 69.3    | 52.5   | 89.2    | 76.6   | 92.8    | 87     | 70.8    | 56.6   | 76      | 65.1   | 93.1    | 85.6   | 92.3    | 85.3   |
| 30      | 35     | 64.4    | 57.8   | 87.3    | 79.9   | 91.7    | 88.8   | 69.1    | 57.7   | 74.7    | 66.2   | 92.2    | 86.3   | 91.4    | 86     |
|         |        | 57.4    | 62.2   | 84.8    | 82.3   | 90.4    | 89.9   | 67.3    | 58     | 73.3    | 67.2   | 91.2    | 86.8   | 90.4    | 86.6   |
|         |        | 52,6    | 65,9   | 82,2    | 84,7   | 88,7    | 90,9   | 65,2    | 60     | 71,5    | 68,2   | 90,1    | 87,4   | 89,2    | 87,2   |
|         |        | 45,2    | 68,5   | 79,4    | 86,3   | 87      | 91,9   | 62,9    | 60,9   | 69,7    | 69,1   | 89      | 87,9   | 88,1    | 87,8   |
|         |        | 38,1    | 70,9   | 76,5    | 87,7   | 85,2    | 92,5   | 60,4    | 61,9   | 67,5    | 69,9   | 87,7    | 88,3   | 86,9    | 88,3   |
|         |        | 31,4    | 72,7   | 73,6    | 88,8   | 83,7    | 93,2   | 57,9    | 62,7   | 65,3    | 70,7   | 86,5    | 88,8   | 85,7    | 88,7   |
|         |        |         |        | 70,9    | 89,6   | 82      | 93,7   | 55,3    | 63,4   | 63,5    | 71,4   | 85,2    | 89,1   | 84,4    | 89     |
|         |        |         |        | 67,8    | 90,3   | 80,3    | 94     | 52,7    | 64,1   | 61,5    | 72,1   | 83,9    | 89,5   | 83,1    | 89,4   |
|         |        |         |        | 64,7    | 90,9   | 80,1    | 94,3   |         |        |         |        |         |        |         |        |

| Temps<br>6h  | Air off | Air on | dc/dt | QO2    | dc/dt+QO2 | 1/K <sub>la</sub> | K <sub>la</sub> |
|--------------|---------|--------|-------|--------|-----------|-------------------|-----------------|
|              | 42      | 30     | 0,02  | 0,314  | 0,334     | 75                | 48              |
|              | 41,2    | 30,2   | 0,24  | 0,314  | 0,554     |                   |                 |
|              | 38,5    | 32,6   | 0,12  | 0,314  | 0,434     |                   |                 |
|              | 33,8    | 33,8   | 0,12  | 0,314  | 0,434     |                   |                 |
|              | 30      | 35     | 0,7   | 0,314  | 1,014     |                   |                 |
| Temps<br>12h | Air off | Air on | dc/dt | QO2    | dc/dt+QO2 | 1/K <sub>la</sub> | K <sub>la</sub> |
|              | 78,7    | 30,1   | 0,96  | 0,5441 | 1,5041    | 55,344            | 65,0477016      |
|              | 76,8    | 39,7   | 0,65  | 0,5441 | 1,1941    |                   |                 |
|              | 74      | 46,2   | 0,63  | 0,5441 | 1,1741    |                   |                 |
|              | 69,3    | 52,5   | 0,53  | 0,5441 | 1,0741    |                   |                 |
|              | 64,4    | 57,8   | 0,44  | 0,5441 | 0,9841    |                   |                 |
|              | 57,4    | 62,2   | 0,37  | 0,5441 | 0,9141    |                   |                 |
|              | 52,6    | 65,9   | 0,26  | 0,5441 | 0,8041    |                   |                 |
|              | 45,2    | 68,5   | 0,24  | 0,5441 | 0,7841    |                   |                 |
|              | 38,1    | 70,9   | 0,18  | 0,5441 | 0,7241    |                   |                 |
|              | 31,4    | 72,7   | 0,727 | 0,5441 | 1,2711    |                   |                 |
| Temps<br>18h | Air off | Air on | dc/dt | QO2    | dc/dt+QO2 | 1/K <sub>la</sub> | K <sub>la</sub> |
|              | 92,5    | 64,7   | 0,42  | 0,2434 | 0,6634    | 62,687            | 57,4281749      |
|              | 92,2    | 68,9   | 0,4   | 0,2434 | 0,6434    |                   |                 |

|              |         |        |            |        |            |                   |                 |
|--------------|---------|--------|------------|--------|------------|-------------------|-----------------|
|              | 91      | 72,9   | 0,37       | 0,2434 | 0,6134     |                   |                 |
|              | 89,2    | 76,6   | 0,33       | 0,2434 | 0,5734     |                   |                 |
|              | 87,3    | 79,9   | 0,24       | 0,2434 | 0,4834     |                   |                 |
|              | 84,8    | 82,3   | 0,24       | 0,2434 | 0,4834     |                   |                 |
|              | 82,2    | 84,7   | 0,16       | 0,2434 | 0,4034     |                   |                 |
|              | 79,4    | 86,3   | 0,14       | 0,2434 | 0,3834     |                   |                 |
|              | 76,5    | 87,7   | 0,11       | 0,2434 | 0,3534     |                   |                 |
|              | 73,6    | 88,8   | 0,08       | 0,2434 | 0,3234     |                   |                 |
|              | 70,9    | 89,6   | 0,07       | 0,2434 | 0,3134     |                   |                 |
|              | 67,8    | 90,3   | 0,06       | 0,2434 | 0,3034     |                   |                 |
|              | 64,7    | 90,9   | 0,69923077 | 0,2434 | 0,94263077 |                   |                 |
|              |         |        |            |        |            |                   |                 |
| Temps<br>24h | Air off | Air on | dc/dt      | QO2    | dc/dt+QO2  | 1/K <sub>la</sub> | K <sub>la</sub> |
|              | 95,2    | 80,1   | 0,28       | 0,1401 | 0,4201     | 55,339            | 65,0535789      |
|              | 95      | 82,9   | 0,22       | 0,1401 | 0,3601     |                   |                 |
|              | 93,8    | 85,1   | 0,19       | 0,1401 | 0,3301     |                   |                 |
|              | 92,8    | 87     | 0,18       | 0,1401 | 0,3201     |                   |                 |
|              | 91,7    | 88,8   | 0,11       | 0,1401 | 0,2501     |                   |                 |
|              | 90,4    | 89,9   | 0,1        | 0,1401 | 0,2401     |                   |                 |
|              | 88,7    | 90,9   | 0,1        | 0,1401 | 0,2401     |                   |                 |
|              | 87      | 91,9   | 0,06       | 0,1401 | 0,2001     |                   |                 |
|              | 85,2    | 92,5   | 0,07       | 0,1401 | 0,2101     |                   |                 |
|              | 83,7    | 93,2   | 0,05       | 0,1401 | 0,1901     |                   |                 |
|              | 82      | 93,7   | 0,03       | 0,1401 | 0,1701     |                   |                 |
|              | 80,3    | 94     | 0,03       | 0,1401 | 0,1701     |                   |                 |
|              | 80,1    | 94,3   |            |        |            |                   |                 |
| Temps<br>30h | 72,9    | 52,7   | 0,13       | 0,1929 | 0,3229     | 65                | 55,3846154      |
|              | 72,8    | 54     | 0,13       | 0,1929 | 0,3229     |                   |                 |
|              | 72,1    | 55,3   | 0,13       | 0,1929 | 0,3229     |                   |                 |
|              | 70,8    | 56,6   | 0,11       | 0,1929 | 0,3029     |                   |                 |
|              | 69,1    | 57,7   | 0,03       | 0,1929 | 0,2229     |                   |                 |
|              | 67,3    | 58     | 0,2        | 0,1929 | 0,3929     |                   |                 |
|              | 65,2    | 60     | 0,09       | 0,1929 | 0,2829     |                   |                 |
|              | 62,9    | 60,9   | 0,1        | 0,1929 | 0,2929     |                   |                 |
|              | 60,4    | 61,9   | 0,08       | 0,1929 | 0,2729     |                   |                 |
|              | 57,9    | 62,7   | 0,07       | 0,1929 | 0,2629     |                   |                 |
|              | 55,3    | 63,4   | 0,07       | 0,1929 | 0,2629     |                   |                 |
|              | 52,7    | 64,1   |            |        |            |                   |                 |
| Temps<br>36h | 77,5    | 61,5   | 0,12       | 0,1544 | 0,2744     | 85                | 42,3529412      |



|              |         |        |       |        |           |                   |                 |
|--------------|---------|--------|-------|--------|-----------|-------------------|-----------------|
|              | 77,4    | 62,7   | 0,11  | 0,1544 | 0,2644    |                   |                 |
|              | 76,9    | 63,8   | 0,13  | 0,1544 | 0,2844    |                   |                 |
|              | 76      | 65,1   | 0,11  | 0,1544 | 0,2644    |                   |                 |
|              | 74,7    | 66,2   | 0,1   | 0,1544 | 0,2544    |                   |                 |
|              | 73,3    | 67,2   | 0,1   | 0,1544 | 0,2544    |                   |                 |
|              | 71,5    | 68,2   | 0,09  | 0,1544 | 0,2444    |                   |                 |
|              | 69,7    | 69,1   | 0,08  | 0,1544 | 0,2344    |                   |                 |
|              | 67,5    | 69,9   | 0,08  | 0,1544 | 0,2344    |                   |                 |
|              | 65,3    | 70,7   | 0,07  | 0,1544 | 0,2244    |                   |                 |
|              | 63,5    | 71,4   | 0,07  | 0,1544 | 0,2244    |                   |                 |
|              | 61,5    | 72,1   |       |        |           |                   |                 |
| Temps<br>42h | Air off | Air on | dc/dt | QO2    | dc/dt+QO2 | 1/K <sub>la</sub> | K <sub>la</sub> |
|              | 94,1    | 83,9   | 0,01  | 0,0977 | 0,1077    | 76                | 47,3684211      |
|              | 94      | 84     | 0,1   | 0,0977 | 0,1977    |                   |                 |
|              | 93,7    | 85     | 0,06  | 0,0977 | 0,1577    |                   |                 |
|              | 93,1    | 85,6   | 0,07  | 0,0977 | 0,1677    |                   |                 |
|              | 92,2    | 86,3   | 0,05  | 0,0977 | 0,1477    |                   |                 |
|              | 91,2    | 86,8   | 0,06  | 0,0977 | 0,1577    |                   |                 |
|              | 90,1    | 87,4   | 0,05  | 0,0977 | 0,1477    |                   |                 |
|              | 89      | 87,9   | 0,04  | 0,0977 | 0,1377    |                   |                 |
|              | 87,7    | 88,3   | 0,05  | 0,0977 | 0,1477    |                   |                 |
|              | 86,5    | 88,8   | 0,03  | 0,0977 | 0,1277    |                   |                 |
|              | 85,2    | 89,1   | 0,04  | 0,0977 | 0,1377    |                   |                 |
|              | 83,9    | 89,5   |       |        |           |                   |                 |
| Temps<br>48h | 93,8    | 83,1   | 0,07  | 0,101  | 0,171     | 118,68            | 30,3336704      |
|              | 93,5    | 83,8   | 0,08  | 0,101  | 0,181     |                   |                 |
|              | 93      | 84,6   | 0,07  | 0,101  | 0,171     |                   |                 |
|              | 92,3    | 85,3   | 0,07  | 0,101  | 0,171     |                   |                 |
|              | 91,4    | 86     | 0,06  | 0,101  | 0,161     |                   |                 |
|              | 90,4    | 86,6   | 0,06  | 0,101  | 0,161     |                   |                 |
|              | 89,2    | 87,2   | 0,06  | 0,101  | 0,161     |                   |                 |
|              | 88,1    | 87,8   | 0,05  | 0,101  | 0,151     |                   |                 |
|              | 86,9    | 88,3   | 0,04  | 0,101  | 0,141     |                   |                 |
|              | 85,7    | 88,7   | 0,03  | 0,101  | 0,131     |                   |                 |
|              | 84,4    | 89     | 0,04  | 0,101  | 0,141     |                   |                 |
|              | 83,1    | 89,4   |       |        |           |                   |                 |

| Temps | Constante | C mmol/l.h | K <sub>la</sub> | OTR        | OUR    | DO   |
|-------|-----------|------------|-----------------|------------|--------|------|
| 6h    | 0,07559   | 0,0317478  | 48              | 1,04718758 | 0,0407 | 42   |
| 12h   | 0,07559   | 0,05948933 | 65,04           | 2,05613543 | 0,0659 | 78,7 |
| 18h   | 0,07559   | 0,06992075 | 57,428          | 0,32557369 | 0,0441 | 92,5 |
| 24h   | 0,07559   | 0,07196168 | 61,05           | 1,43074211 | 0,0292 | 95,2 |
| 30h   | 0,07559   | 0,05510511 | 55,38           | 0,65765312 | 0,0176 | 72,9 |
| 36h   | 0,07559   | 0,05858225 | 42,35           | 0,72027821 | 0,0167 | 77,5 |
| 42h   | 0,07559   | 0,07113019 | 42,368          | 0,18895323 | 0,0174 | 94,1 |
| 48h   | 0,07559   | 0,07090342 | 41,33           | 0,19369635 | 0,0184 | 93,8 |