#### Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-ETE

# Facteurs et méthodes sous-jacents à l'amélioration de la performance des procédés de production du biopesticide à base de *B. thuringiensis* en utilisant comme substrat des boues d'épuration des eaux usées

#### Par **Kanza Lachhab** M. Sc. Eau

Thèse présentée pour l'obtention de grade de Philosophiae Doctorat (Ph.D.) en Sciences de l'Eau

#### Jury d'évaluation

Examinateur Externe

Robert Hausler, Ph.D.

Université du Québec à Montréal (UQAM)

Examinateur Externe

Danielle Prévost, Ph.D.

Centre de recherches et de développement sur les sols et les grandes

cultures, Agriculture et Agroalimentaire Canada

Agriculture Canada

Examinateur interne

J. L. Sasseville, Ph.D.

**INRS-ETE** 

Université du Québec

Codirecteur

José Valéro, Ph.D.

Centre de Foresterie des Laurentides

Ressources Naturelles Canada

Directeur de recherche

Rajeshwar D. Tyagi, Ph.D.

**INRS-ETE** 

Université du Québec



#### **AVANT-PROPOS**

Ce travail s'est réalisé grâce aux soutiens multiples et multiformes de plusieurs personnes. Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, R. D. Tyagi, professeur à l'INRS-ETE, à qui je témoigne de ma profonde reconnaissance. Sans lui rien de tout cela n'a été possible, à l'aide de la qualité de son encadrement, j'ai pu bénéficier de conditions matérielles et intellectuelles stimulantes pour la recherche.

Pour avoir accepté la codirection de cette thèse, je tiens également à remercier le docteur José Valéro, chercheur au Centre de Foresterie des Laurentides (Ressources Naturelles Canada) qui m'a aidé avec beaucoup de compétence et de dévouement dans la confection de cette thèse.

J'adresse aussi mes remerciements aux autres membres du Jury d'évaluation, soient Mme Danielle Prévost, du Département des sols et de génie agroalimentaire (Agriculture Canada), M. J. L. Sasseville, de l'INRS-ETE (Université du Québec), M. Robert Hausler, de l'Université du Québec à Montréal (UQAM), pour leur implication dans ce travail.

Je remercie l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-ETE), le Centre de Foresterie des Laurentides (Ressources Naturelles Canada) et Biogénie qui m'ont ouvert leur laboratoire et m'ont grandement aidé dans la réalisation de mes travaux de recherche. Cela a été une expérience très enrichissante pour moi.

Mes remerciements à ma mère, à mon père, à mes sœurs et à mes frères qui m'ont supportés tout le long de mes études. Le souci constant de les honorer m'a été une source de motivation. C'est l'occasion de témoigner également ma reconnaissance à mon mari qui, par son support indéfectible, m'aura été d'un grand secours à plusieurs reprises tout au long de la réalisation de cet ambitieux projet.

Enfin, je salue tous ceux et celles, amis (es) et collègues de travail, qui de près ou de loin m'ont apporté leur soutien moral durant mes années de doctorat.



### **RÉSUMÉ**

Les capacités de **divers sérotypes de** *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) d'utiliser différentes sources de carbone et d'azote ont été évaluées en comparant la croissance d'une souche sauvage *Bta* et qui a été isolée directement des boues de l'usine de traitement des eaux usées de la CUQ, vis-à-vis de celle de *Bt* var. kurstaki (*Btk* ou *Bt-HD1*), d'une part, dans le milieu commercial à base de soya, et d'autre part, dans différents types de substrats subissant ou non des traitements par hydrolyse acide, alcaline ou enzymatique. Toutes les expériences ont été réalisées en erlenmeyers sous une agitation de 250 rpm et en bioréacteur sous une agitation de 350 rpm et à une température constante de 31°C. Les résultats montrent que *Bta* croît mieux que *Btk* dans les boues. L'utilisation d'une souche isolée à partir des boues, pour la production de *Bt* dans des substrats appropriés, conduit donc à l'obtention d'un Bacille plus performant. L'utilisation d'amidon comme substrat ainsi que l'hydrolyse enzymatique des boues ont permis d'obtenir des suspensions de *Bt* ayant un meilleur potentiel entomotoxique. Dans ce dernier cas, le pouvoir insecticide de *Bta* a augmenté d'environ 13%; il a atteint 13540 UI/μl.

Le potentiel entomotoxique de *Bta* a été confirmé par une caractérisation génétique à l'aide de l'amplification en chaînes (PCR) de l'ADN. Ceci a permis de mettre en évidence la présence chez ce bacille des gènes Cry IA et Cry IC codant des séquences protéiques actives contre les larves de Lépidoptères. Par ailleurs, les boues ne semblent pas perturber les caractéristiques physiologiques de *Bt*. Enfin les boues de la CUQ et celles d'amidon ont un certain pouvoir tampon plus fort que celui du milieu conventionnel à base de soya.

L'utilisation de **différents types de milieux** pour la culture de *Bt*, à savoir, boues mixtes de la station d'épuration de la CUQ, boues primaires et secondaires de la station d'épuration des eaux usées de Valcartier, boues de levure et boues d'amidon, a permis de constater que ces milieux ne perdent pas leur faculté toxique. Par ailleurs, ce sont ces boues d'amidon qui ont permis de produire un biopesticide plus efficace (nombre de cellules et de spores sont respectivement de 1.3x10<sup>10</sup> UFC/ml, 1.1x10<sup>10</sup> UFC/ml). Le potentiel entomotoxique a atteint des valeurs de 13115 UI/µl. Il est cependant important de signaler que les boues de la CUQ ont permis d'obtenir des résultats concurrentiels. Le mélange de trois types de boues à savoir les boues de la CUQ, les boues d'amidon et les boues de levure était une pratique fort intéressante du

moment qu'il a permis d'améliorer la croissance et la sporulation de Bt. Le nombre de cellules et de spores a atteint des valeurs de  $8.1 \times 10^{10}$  UFC/ml,  $7.7 \times 10^{10}$  UFC/ml, le potentiel entomotoxique quant à lui a atteint 13370 UI/ $\mu$ l. Il importe de noter également que l'hydrolyse des boues a permis d'améliorer la concentration des cellules et des spores.

Les résultats de **l'optimisation des solides totaux** (ST) dans les boues ainsi que de l'inoculum au cour de la fermentation de Bt et qui ont fait l'objet d'une publication (Lachhab et al., 2001) ont montré que la concentration des ST influence considérablement la croissance et l'efficacité entomopathogène de cet insecticide microbien. En effet, une concentration de 46 g/l entraîne une réduction non seulement de la croissance des cellules et des spores qui sont respectivement de 5.4x10<sup>8</sup> UFC/ml et 4.8x10<sup>8</sup> UFC/ml mais également une faible toxicité, soit 9743 UI/µl; le taux de sporulation étant de 89%. Ceci a également été constaté dans le cas d'une faible concentration des ST dans les boues (10 g/l) où l'entomotoxicité fut de 8231 UI/µl. Cependant, un optimum de 26 g/l de ST permet d'obtenir un meilleur potentiel entomotoxique (12970 UI/µl). Le nombre de cellules et de spores dans ce cas était respectivement de 5.0x10<sup>9</sup> UFC/ml et 4.2x10<sup>9</sup> UFC/ml et un pourcentage de sporulation de 96%.

Les recherches visant **l'optimisation de l'inoculum** ont permis non seulement d'observer une amélioration de la croissance et de l'entomotoxicité du biopesticide *Bt* mais également une réduction de la phase de latence. La préparation de la préculture dans le même milieu de culture que celui de la production finale de *Bt* (Boues) a permis d'améliorer le nombre final des cellules et des spores. Le taux de croissance spécifique dans le cas d'une préculture dans les boues (0.3205 h<sup>-1</sup>) est plus élevé que dans le cas du TSB (0.1984 h<sup>-1</sup>). Il a été également montré que l'efficacité de Bt dépend étroitement du pourcentage de l'inoculum utilisé. Le nombre des cellules a atteint 2.2x10<sup>9</sup> UFC/ml dans le cas d'un pourcentage d'inoculum de 2%. Cependant, ce dernier reste relativement faible dans le cas de 4% et 5%. Les résultats des bioessais ont aussi montré qu'un inoculum de 2% permet d'obtenir une meilleure entomotoxicité (12900 UI/μl) (Lachhab et al., 2001).

Deux phénomènes très importants dans la culture de *Bt* dans les boues ont favorisé la réalisation de **la double inoculation**, technique développée au cours de ce travail. D'une part, les boues sont des substrats complexes et riches en carbone et en azote pouvant être utilisés par les bactéries directement ou après hydrolyse par des enzymes aux cours de la fermentation. D'autre

part, Bt libère des protéines intracellulaires au cours de la sporulation, qui peuvent être utilisées par un deuxième inoculant. En effet, la réalisation d'une deuxième inoculation dans le surnageant des boues de la CUQ a permis de constater qu'après une première inoculation, les boues sont encore capables de supporter la croissance et la sporulation de Bt. Une concentration des cellules de l'ordre de  $4.3 \times 10^7$  UFC/ml et un potentiel entomotoxique de 7827 UI/µl, ont été obtenus dans ce cas. Ainsi, l'utilisation d'une deuxième inoculation a permis non seulement d'améliorer la croissance des cellules et des spores de Bt mais également d'augmenter son potentiel entomotoxique. Le nombre de cellules obtenues est de l'ordre de 9x1012 UFC/ml et l'entomotoxicité est d'environ 15980 UI/μl. Ce qui est fort intéressant par rapport au milieu synthétique à base de soya qui permet d'obtenir des suspensions de Bt dont le potentiel entomotoxique est estimé à 12600 UI/µl. Cette méthode simple et facile à manipuler a également montré son efficacité pour une utilisation rationnelle de l'aération et du substrat de culture qui représente 35% à 50% du coût de production de Bt. Les phases d'anaérobioses qui peuvent être engendrées par une forte concentration bactérienne au cours de la sporulation ont pu être évitées. Le suivi de O2 a permis de constater que dans le cas de deux inoculations la concentration de cet élément dans le milieu de culture reste supérieure à 4 ppm durant la fermentation de Bt, ce que je n'ai pas remarqué dans le cas d'une seule inoculation de 2% où la concentration de O2 atteint des valeurs inférieures à 2 ppm. Il importe de noter que la réalisation de la double inoculation dans le cas du milieu synthétique n'a pas été aussi performante que dans les boues; cela peut être expliqué par la nature du milieu.

L'optimisation du pourcentage d'inoculum dans le cas de deux inoculations permet de constater qu'un pourcentage de 1% permet d'obtenir non seulement une meilleure croissance de Bt mais également un meilleur potentiel entomotoxique. De même la réalisation de la double inoculation après 15h permettrait au premier inoculant d'atteindre la phase de sporulation, d'obtenir un temps de fermentation optimum et enfin d'utiliser de façon rationnelle le milieu de culture et le système d'aération et ainsi réduire le coût de production. D'autres paramètres comme le pH,  $O_2$ ,  $CO_2$ , ont également été évalués au cours des expérimentations.

## TABLE DES MATIÈRES

A۱	VANT-PROPOS	I
RI	ÉSUMÉ	III
T/	ABLE DES MATIÈRES	VII
LI	STE DES FIGURES	XIII
LI	STE DES TABLEAUX	XV
	TRODUCTION	
1	APERÇU GÉNÉRAL SUR LA PRODUCTION DU BIOPESTICIDE À BASE	
	THURINGIENSIS	7
	1.1 LES BIOPESTICIDES	7
	1,1.1 La bactérie B. thuringiensis	8
	1.1.1.1 Généralités	8
	1.1.1.2 Croissance et métabolisme de <i>Bt</i>	
	1.1.1.3 Sporulation de <i>B. thuringiensis</i>	11
	1.1.1.4 Production de la δ-endotoxine	11
	1.1.1.5 Mode d'action de B. thuringiensis contre les insectes	13
	1.1.1.6 Identification et caractérisation de <i>B. thuringiensis</i>	15 
	1.2 LES BOUES DES STATIONS D'ÉPURATIONS DES EAUX USÉES : UN SUBSTRAT	
	PROMETTEUR POUR LA CULTURE DE BT	15
	1.3 FACTEURS POUVANT INFLUENCER LE POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE DE BT	`17
	1.3.1 Milieu de culture et son impact sur la production de Bt	17
	1.3.2 Les conditions de fermentations et son effet sur la production de Bt	19
	1.3.3 Effet de l'inoculum	20
	1.4 LA DOUBLE INOCULATION: UNE NOUVELLE TECHNIQUE PERMETTANT	
	D'AMÉLIORER LA CROISSANCE DE BT ET LE POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE	
	1.4.1 Utilisation de sous produits agro-industriels	21
	1.4.2 Utilisation de technique d'enrichissement	21
	1.4.3 Utilisation de différentes sérotypes de Bt afin d'améliorer sa toxicité	22
	1.4.4 Optimisation des conditions de fermentation	22
	1.4.5 Principe de la double inoculation	23
2	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	27
3	MATÉRIELS ET MÉTHODES	31
	3.1 MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	32
	3.1.1 Échantillonnage des boues	32
	3.1.2 Caractérisation des boues	32
	3.1.3 Détermination des solides totaux (ST)	33

3.1.4 P	rétraitement hydrolytique des boues	33
	Iilieu synthétique	
3.1.6 C	Culture de Bt	34
3.1.6.1	Préculture	34
3.1.6.2		
3.1.7 P	rotocole expérimental pour dénombrer les cellules et les spores	35
	Préparation des boites de Pétri	
3.1.7.2	Préparation des dilutions pour inoculer les boîtes de Pétri	35
	étermination de l'entomotoxicité par des bioessais	
	Insecte cible et élevage	
	Préparation de la diète	
3.2 MÉ	THODOLOGIE SPÉCIFIQUE	37
	ffet de la variété de Bt sur la croissance, la sporulation et la production de	
	endotoxine	
3.2.1.1	1 was a series at 200 (so well saw age 150100 a parent aces 600	
	et de <i>Btk</i> (souche de référence)	37
3.2.1.2	1	
	souches Btk, Bta	
3.2.1.3	. 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	
3.2.1.4		
	ffet du milieu de culture, des différents type de traitement et de l'enrichissemen	
	e dernier sur la croissance et la production du complexe spore cristaux	
3.2.2.1	1	
3.2.2.2	synthétique à base de farine de soya	40
3.2.2.2	Influence de la concentration des solides totaux (ST) dans les boues de la C sur la croissance de <i>Bt</i>	υQ
3.2.2.3		
3.2.2.3	Comparaison de la croissance de <i>Bt</i> dans les boues primaires et secondaires Valcartier	
3.2.2.4		41
J.2.2. !	d'amidon et de levure	42
3.2.2.5		42 LIO
	de boues d'amidon et de levure	
3.2.3 Ét	tude de l'effet du traitement des boues sur la croissance de Bt	
	fluence de source additionnelle (extrait de levure) sur la croissance de Btk	
	fluence de l'inoculum	
3.2.5.1		44
3.2.5.2		
	croissance de Bta	45
$3.2.6 L^{2}$	'effet d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Bt	45
3.2.6.1	Protocole de la deuxième inoculation	45
3.2.6.2	Étude de la deuxième inoculation dans le surnageant	
3.2.6.3	1	
	inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Bt	47
3.2.6.4	the state of the s	
	deuxième inoculation	47

	3.2.6.5		Btk et
		son entomotoxicité	40
	3.2.6.6	Expérience réalisée en fermenteur pour le suivi de l'évolution de l'oxygère	1e et
	0.065	du pH dans les boues de la CUQ  Étude de l'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la deux	49 viàma
	3.2.6.7	inoculation	40 40
	2269		tvnes
	3.2.6.8	d'inoculation (1%+1% et 2%)	50
	3.2.7 M	Méthodologie de l'étude des protéases sur les boues dans le cas de la deuxièm	e
	3.2.7 IV.	noculation	50
	3.2.8 M	Aatériels utilisés (Bioréacteurs 15L)	52
	3.2.9 S	térilisation des boues dans les bioréacteurs 15L	53
	3.2.10 In	noculation des boues et fermentation dans le bioréacteur 15L	53
		SULTATS	
4			
		FET DE SOUCHES NATURELLES DE BT : COMPARAISON DE LA CROISSA	NCE
	DE I	DEUX SOUCHES BTK, BTA DANS LES BOUES MIXTES DE LA CUQ EN	
	FER	RMENTEUR	55
	4.1.1 É	Evolution de O2 et de CO2	56
	4.1.2 A	Inalyse comparative de la croissance et l'entomotoxicité de Bta et de Btk	58
	4.1.3 C	Caractérisation génétique de Bta	60
	4.2 Eff	FET DU MILIEU DE CULTURE, DES DIFFÉRENTS TYPE DE TRAITEMENT I	ΞT
	D'A	AJOUT DE NUTRIMENT SUR LA CROISSANCE ET L'ENTOMOTOXICITÉ	62
	4.2.1 É	Étude préliminaire : Comparaison de la croissance de Btk dans les boues mix	tes de
	la	a CÚO et le milieu synthétique à base de farine de soya	62
	4.2.2 E	Étude de l'effet de la concentration des solides totaux (ST) des boues mixtes de	e la
		CUO sur la croissance de Bta et Btk	63
	4.2.3 E	Etude de l'effet du type de boues sur la croissance de Bta et Btk	66
	4.2.3.	1 Boues primaire et secondaire de Valcartier	66
	4.2.3.2	Boues de levure, boues d'amidon et boues de la CUQ	69
	4.2.3.	Étude de la croissance des deux souches (Btk et Bta) dans le cas de mélar	ige de
		différents types de boues : CUQML, CUQMA, CUQMAL, CUQM	/3
	4.2.3.4		74
	424 1	avec différents types de traitement : acide, alcalin et avec des enzymes Influence d'ajout de source additionnelle d'extrait de levure (EL) sur la croiss	/ <b>-1</b> sance
	4.2.4 I	le B. thuringiensisle	,ance 75
	4.2.5 E	Étude de la reproductivité des boues	76
	4.2.5 L	Étude de l'évolution de l'entomotoxicité en fonction du temps	77
		UDE DE L'EFFET DE L'INOCULUM SUR LA PRODUCTION DE B.	
		URINGIENSIS	79
	1H)	ORINGIENSIS Effet du milieu de préparation de l'inoculum sur la production de Bta et Btk	79
	4.3.1 E	Effets du pourcentage d'inoculum utilisé initialement	81
	4.3.2 E	FETS DE LA DOUBLE INOCULATION SUR LA PRODUCTION DE B.	
	4.4 EF	TETS DE LA DOUBLE INOCULATION SUR LA I RODUCTION DE D.	84
	TH	URINGIENSIS Étudo de la double inoculation dans le surnageant	87

	4.4.2	Étude de l'effet de différent pourcentage d'inoculum dans le cas d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Btk
	4.4.3	Effet du temps de la deuxième inoculation sur la croissance et la toxicité de Btk89
	4.4.4	Etude de l'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes (voir méthodologie section 3.2.6.7) sur la deuxième inoculation
	4.4.5	Étude de l'effet de la concentration des solides totaux dans les boues sur la deuxième inoculation
	4.4.6	Analyse comparative des deux types d'inoculum 91
	4.4.7	Résultat de l'application de la deuxième inoculation dans les bioréacteurs 15A, 15B en utilisant les boues secondaires de la CUQ
	4.4.8	Étude de l'évolution de l'oxygène dans le cas de la deuxième inoculation95
		Évolution du pH dans le cas de la deuxième inoculation
	4.4.10	Étude de l'évolution des solides totaux dans les boues secondaires au cours de la fermentation de Bt
		Étude de l'évolution de la concentration du carbone dans le cas de la double inoculation98
	4.4.12	Étude de l'activité protéolytique de Bt dans le cas de la deuxième inoculation99
5	D	ISCUSSIONS SPÉCIFIQUES103
	5.1 E	FFET DE SOUCHES NATURELLES DE BT : COMPARAISON DE LA CROISSANCE
	D	E DEUX SOUCHES BTK, BTA DANS LES BOUES MIXTES DE LA CUQ EN
		ERMENTEUR103
		FFET DU MILIEU DE CULTURE, DES DIFFÉRENTS TYPES DE TRAITEMENT ET
		'AJOUT DE NUTRIMENTS SUR LA CROISSANCE ET L'ENTOMOTOXICITÉ105
	5.2.1	Étude préliminaire : Comparaison de la croissance de Btk dans les boues mixtes de
	5.2.2	la CUQ et le milieu synthétique à base de farine de soya
		Effet de la concentration des solides totaux (ST) des boues mixtes de la CUQ sur la croissance de Bta et Btk
		Effet du type de boues sur la croissance de Bta et Btk
		3.1 Boues primaires et secondaires de Valcartier
	5.2.3 5.2.3	,
	5.2.3 5.2.3	r =
	3.2.3	(- w v - w) was a same was significant stypes
	5.2.4	de boues : CUQML, CUQMA, CUQMAL, CUQM
	3.2.7	traitements: acide, alcalin et avec des enzymes
	5.2.5	Influence d'ajout de source additionnelle d'extrait de levure sur la croissance de
	5.2.5	Bt
	5.2.6	Évolution de l'entomotoxicité de Bt en fonction du temps
	5.3 É	TUDE DE L'EFFET DE L'INOCULUM SUR LA PRODUCTION DE B.
		HURINGIENSIS114
	5.3.1	Effet du milieu de préparation de l'inoculum sur la production de Bta et Btk114
	5.3.2	Effet du pourcentage d'inoculum utilisé initialement pour la fermentation de Bt 115
	5.4 E	FFETS DE LA DOUBLE INOCULATION SUR LA PRODUCTION DE B.
	TI	HURINGIENSIS116

	5.4.1	Étude d'une deuxième inoculation dans le surnageant	117
	5.4.2	Effet de différents pourcentages d'inoculum dans le cas de la double inoculation	on sur
		la croissance et l'entomotoxicité de Btk	118
	5.4.3	Effet du temps de la réalisation de la deuxième inoculation sur la croissance d	'e
		Rtk	119
	5.4.4	Effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la double inoculation	119
	5.4.5	Effet de la concentration des ST dans les boues sur la double inoculation	120
		APPLICATION DE LA DOUBLE INOCULATION DANS LES BIORÉACTEURS 15	5A,
		15B EN UTILISANT LES BOUES SECONDAIRES DE LA CUQ COMME	
	;	SUBSTRAT	121
	5.5.1		121
	5.5.2	Évolution du pH dans le cas de la double inoculation	122
	5.5.3	Évolution des solides totaux (ST) dans les boues secondaires au cours de la	
		fermentation de Bt	123
	5.5.4		123
		Étude de l'activité protéolytique de Bt dans le cas de la double inoculation	
6		RÉFLEXION GÉNÉRALE :	124
	6.1	LES BESOINS EN MATIÈRE DE BIOPESTICIDES	125
	6.2	LE MARCHÉ DES BIOPESTICIDES	126
		TECHNOLOGIE DE PRODUCTION DE BT ET ENJEUX	
		CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	
7			
	7.1	EFFET DU TYPE DE BOUES	131
	7.2	EFFET DE SOUCHE NATURELLE DE B. THURINGIENSIS	132
		L'EFFET DE L'INOCULUM	
		EFFET DE LA TECHNIQUE DE LA DOUBLE INOCULATION	
		NCES	
G]	LOSSA	IRE	147
	NNEXI		



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Des spores de $Bt$ et de $\delta$ -endotoxines cristallisées (Institut Pasteur, photo Jacques Ribier). 12
Figure 1.2: Mode d'action des séquences protéiques dans l'épithélium intestinal des larves de Lipidoptères (Sanchis et al., 1996)
Figure 1.3 : Tordeuses des bourgeons de l'Épinette, du même âge (Centre de Foresterie des Laurentides, Ressources Naturelles Canada)
Figure 3.1: Photo représentant le fermenteur 15L
Figure 4.1: Comparaison de la croissance de Bta et Btk dans des boues mixtes de la CUQ : Nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe II, Tableau 8.7)
Figure 4.2: Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> et <i>Btk</i> dans les boues mixtes de la CUQ : Nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe II, Tableau 8.7)
Figure 4.3: Évolution de la concentration de CO <sub>2</sub> contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : Cas des deux souches <i>Bta</i> et <i>Btk</i> (Voir annexe II, Tableau 8.8)
Figure 4.4: Évolution de la concentration de l'oxygène contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15Aet 15B : cas des deux souches <i>Bta</i> et <i>Btk</i> (Voir annexe II, Tableau 8.8)
Figure 4.5: Electrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification d'ADN de la souche <i>Bta</i> et de la souche de références <i>Btk</i> : caractérisation globale recherche du gène CryIC spécifique contre les Lépidoptères
Figure 4.6: Electrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification d'ADN de la souche <i>Bta</i> et de la souche de références <i>Btk</i> : caractérisation spécifique recherche du gène CryIA61
Figure 4.7: Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans le milieu synthétique (soya) et dans les boues de la CUQ: Nombre de cellules et de spores en fonction du temps (Voir annexe II Tableau 8.6)
Figure 4.8: Comparaison de l'évolution de O <sub>2</sub> dans les boues de la CUQ dans le cas de deux concentrations de 26 g/l et 46 g/l (Voir annexe V, Tableau 8.19 et 8.20)
Figure 4.9: Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans boues de la CUQ : nombre de cellules selon différentes concentrations de solides totaux (36 g/l, 26 g/l) en fonction du temps (Voir annexe V, Tableau 8.17)
Figure 4.10: Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans boues de la CUQ : nombre de spores selon différentes concentrations de solides totaux (36 g/l, 26 g/l) en fonction du temps (Voir annexe V, Tableau 8.17)
Figure 4.11: Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans les boues primaires et secondaires de Valcartier : nombre de cellules obtenues en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.9)
Figure 4.12 : Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans les boues primaire et secondaire de Valcartier : nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.9)
Figure 4.13 : Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans différents types de boues à savoir de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)71
Figure 4.14: Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans le cas des boues de la CUQ, d'amidon et des boues de levure : nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)

Figure 4.15 : Évolution du pH lors de la fermentation de <i>Btk</i> dans l'amidon, la levure et les boues mixtes de la CUQ (Voir annexe III, Tableau 8.12)
Figure 4.16: Évolution du potentiel entomotoxique des suspensions de <i>Btk</i> obtenues en fonction du temps (Voir annexe IX, Tableau 8.27 a)
Figure 4.17 : Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans le cas de deux milieux de préculture TSB et boues : Nombre de cellules en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)
Figure 4.18 : Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans deux milieux de préculture TSB et boue : Nombre de spores en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)
Figure $4.19$ : Comparaison de la croissance de $Btk$ dans le cas de différent pourcentage (V/V) d'inoculum $1\%$ , $2\%$ , $4\%$ : Nombre de cellules en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau $8.25$ )83
Figure 4.20 : Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans le cas de différents pourcentages (V/V) d'inoculum : 1%, 2%, 4% : Nombre de spores en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.25)
Figure 4.21 : Évolution de la croissance de <i>Bta</i> dans les boues de la CUQ et avec une deuxième inoculation et une seule inoculation : Nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe X, Tableau 8.28 a)
Figure 4.22 : Évolution de la croissance de <i>Bta</i> dans les boues de la CUQ avec une deuxième inoculation et une seule inoculation : Nombre de spores en fonction du temps. (Voir annexe X, Tableau 8.28 a) 86
Figure 4.23: Évolution de la croissance de Bt dans les boues secondaires de la CUQ avec une deuxième inoculation et une seule inoculation : Nombre de cellules et de spores en fonction du temps (Voir annexe X-4, Tableau 8.38)
Figure 4.24 : Évolution de la concentration de l'oxygène contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : Comparaison des deux méthodes d'inoculation (souche <i>Btk</i> ) (Voir annexe X-4, Tableau 8.39)
Figure 4.25 : Évolution du pH dans le cas de la deuxième inoculation réalisé en bioréacteur : Comparaison avec une seule inoculation (Voir annexe X-4, Tableau 8.39)
Figure 4.26: Évolution des solides totaux dans les boues secondaires en fonction du temps de fermentation (Voir annexe X-4, Tableau 8.41)98
Figure 4.27 : Étude de l'évolution du carbone total dans le cas de la deuxième inoculation et comparaison avec celle ou une seule inoculation de 2% a été faite (Voir annexe X-4, Tableau 8.40)99
Figure 4.28 : Activité protéolytique (UI/ml) dans le cas d'une seule inoculation de 2% et dans le cas de deux inoculations chacune de 1% (Voir annexe X-3, Tableau 8.35)
Figure 4.29 : Évolution de l'activité protéolytique dans le milieu soya et dans les boues de la CUQ : Cas de la deuxième inoculation (Voir annexe X-3, Tableau 8.36)
de la deuxième inoculation (Voir annexe X-3, Tableau 8.36)

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Variétés de Bt avec les types d'insectes pouvant être contrôlés10
Tableau 3.1 : Répartition des gènes Cry dans quelques sous-variétés de Bt
Tableau 3.2 : Préparation des échantillons pour la PCR (concentration des réactifs)
Tableau 4.1: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de <i>Bta</i> et <i>Btk</i> dans les deux milieux soya et boue (cas du nombre de cellules)
Tableau 4.2 : L'intervalle de confiance dans le cas du nombre de cellules calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions
Tableau 4.3: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de <i>Bta</i> et <i>Btk</i> dans les deux milieux soya et boue (cas de l'entomotoxicité)
Tableau 4.4 : L'intervalle de confiance dans le cas de l'entomotoxicité calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions
Tableau 4.5: Croissance de <i>Btk</i> dans des boues contenants différentes concentrations de solides totaux : nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (1) (Voir annexe V, Tableau 8.17)64
Tableau 4.6: Croissance de <i>Bta</i> dans des boues contenants différentes concentrations de solides totaux : nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (1) (Voir annexe V, Tableau 8.18)64
Tableau 4.7: Croissance de <i>Bta</i> dans des boues primaires et secondaires de Valcartier: nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (Voir annexe III, Tableau 8.9)67
Tableau 4.8: Croissance de <i>Btk</i> dans des boues primaires et secondaires de Valcartier: Nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (Voir annexe III, Tableau 8.10)67
Tableau 4.9 : Croissance de <i>Bta</i> dans le cas des mixtes de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules et de spores et entomotoxicité (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)70
Tableau 4.10 : Croissance de <i>Btk</i> dans le cas des boues mixtes de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules et de spores et entomotoxicité. (Voir annexe III, Tableau 8.11 b)
Tableau 4.11 : Étude de la croissance de <i>Bta</i> et <i>Btk</i> dans le cas d'une mixture de boue d'amidon, de boue de levure et de boues mixtes de la CUQ (CUQM) (Voir annexe III, Tableau 8.13 et 8.14)73
Tableau 4.12 : Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans des boues avec et sans traitement acide, alcali, et enzymatique (Voir annexe IV, Tableau 8.15)
Tableau 4.13 : Comparaison de la croissance de <i>Btk</i> dans des boues avec ou sans traitement acide (Voir annexe IV, Tableau 8.16)
Tableau 4.14 : Effet de l'ajout d'extrait de levure sur la croissance des cellules et des spores et du potentiel entomotoxique de <i>Bt</i> (Voir annexe VI, Tableau 8.21)
Tableau 4.15 : Étude de l'effet du temps d'échantillonnage des boues de la station d'épuration des eaux usées sur la croissance et l'entomotoxicité de <i>Bta</i> (Voir annexe VII, Tableau 8.22)77
Tableau 4.16 : Résultats de la croissance de <i>Btk</i> avec deux milieux de préculture à savoir les boues et la TSB(1). (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)
Tableau 4.17 : Résultats de la croissance de <i>Bta</i> avec deux milieux de préculture à savoir les boues et la TSB. (Voir annexe VIII, Tableau 8.24)

Tableau 4.18 : Comparaison du nombre de cellules et de spores <i>Btk</i> obtenu dans le cas de différent pourcentage d'inoculum (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.25)	.82
Tableau 4.19 : Comparaison du nombre de cellules et de spores <i>Bta</i> obtenu dans le cas de différent pourcentage d'inoculum (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.26)	.82
Tableau 4.20 : Comparaison de la croissance de <i>Bta</i> dans les boues de la CUQ et d'amidon : Nombre de cellules et de spores et potentiel entomotoxique dans le cas d'une inoculation vs deux inoculations (Voir annexe X, Tableau 8.28a et b)	
Tableau 4.21 : Étude de la croissance de <i>Bt</i> dans le surnageant des boues et du milieu soya après 24 h de fermentation (Voir annexe X-1, Tableau 8.29)	
Tableau 4.22 : Comparaison de la croissance de <i>Bt</i> dans le cas de la double inoculation de 1% et 1,5% e avec la croissance de <i>Bt</i> dans le cas d'une seule inoculation de 2% et de 3% (Voir annexe X-2, Tableau 8.30)	
Tableau 4.23 : Comparaison de la croissance de <i>Bt</i> dans le cas de deux inoculations, la deuxième inoculation est réalisée après 15h, 24 h, 36h, et 48 de fermentation (Voir annexe X-2, Tableau 8.31	)89
Tableau 4.24 : L'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la deuxième inoculation (Voir annexe X-2, Tableau 8.33)	.90
Tableau 4.25 : Comparaison de la quantité de cellules et de spores viables <i>Btk</i> obtenue par fermentation dans les boues mixtes de la CUQ dans le cas de l'utilisation de deux inoculations (Voir annexe X-2 Tableau 8.32)	,
Tableau 4.26 : Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de <i>Btk</i> dans le cas des deux types d'inoculation dans les boues de la CUQ (Nombre de cellules)	
Tableau 4.27 : L'intervalle de confiance dans le cas du nombre de cellules calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions	.92
Tableau 4.28 : Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de <i>Btk</i> dans le cas des deux types d'inoculation dans les boues de la CUQ (cas de l'entomotoxicité)	.93
Tableau 4.29: Intervalle de confiance dans le cas de l'entomotoxicité calculé avec une limite de confian de 95% pour les différents traitements et leurs interactions	.93
Tableau 4.30 : Paramètres à utiliser au cours de la fermentation.	.93
Tableau 4.31 : Résultat de l'application des résultats dans les fermenteurs 15A et 15B	.95

# INTRODUCTION

#### INTRODUCTION

#### Les biopesticides et leur importance

Depuis une trentaine d'années, les chercheurs s'intéressent un peu partout dans le monde au développement de pesticides biologiques, ou biopesticides (Silvy et al., 2001). Cet intérêt est stimulé par l'impact des pesticides chimiques sur la santé et l'environnement (Harris, 1999). En effet, les insecticides chimiques ne sont pas des agents de traitement sélectifs (Fisher, 1993; Carlton, 1990). La résistance de certains insectes limite considérablement l'efficacité de ces derniers. Enfin, l'utilisation des produits issus de la chimie de synthèse a engendré auprès des consommateurs une suspicion sur la qualité sanitaire des produits agro-alimentaires. Cette perte de confiance provoque la remise en cause de la pertinence de l'utilisation des insecticides chimiques. Étant donné que l'élimination des effets pervers de l'utilisation des insecticides chimiques et de leurs dérivés de l'environnement est quasi impossible, il est nécessaire de chercher d'autres moyens plus spécifiques et sécuritaires que les insecticides chimiques, mais aussi plus efficaces et moins polluants. Cela permettrait de réduire l'utilisation des insecticides chimiques.

Le développement de procédés biologiques peut être une bonne alternative. C'est pourquoi depuis 1975, beaucoup de recherches ont été faites dans le but de développer de nouveaux produits de lutte contre les insectes des forêts en tenant compte de l'environnement et de la santé publique. L'utilisation de microorganismes entomopathogènes tels que les bactéries, les virus, les protozoaires et les champignons (Aronson et al., 1986; Burges, 1986; Daoust, 1990) comme agent de lutte biologique est une alternative qui fait l'objet de recherches intensives dans le monde entier depuis les années soixante (Ejiofor, 1991).

Au Canada, on compte beaucoup sur les biopesticides comme Bt, dont certains sérotypes possèdent un pouvoir insecticide pour combattre une gamme croissante d'insectes ravageurs des ressources forestières. En effet, au cours de sa sporulation Bt produit un cristal protéinique appelé Delta toxine qui contient des séquences protéiniques qui sont toxiques pour divers insectes (Valéro, 1990). Depuis sa découverte au début du  $20^e$  siècle, l'utilisation de Bt s'est répandue à travers le monde (Klausner, 1984; Lisansky, 1993). Différentes suspensions de Bt ont été mises sur le marché depuis 1960 et les ventes mondiales représentaient 45 à 60 millions de \$US en 1992 (Lisansky et al., 1993). Aujourd'hui, Bt est le biopesticide le plus utilisé et représente entre

80 à 90% du marché des agents biologiques dans le monde (Bernhard et Utz, 1993). En l'an 2000, les ventes ont été estimées à 300 millions \$US (McKenny, 1991).

Plusieurs avantages liés au biopesticide *Bt* favorisent l'expansion de son utilisation. *Bt* a l'avantage, par rapport aux insecticides chimiques, d'agir de façon très spécifique contre les insectes sensibles (Burges et Hussey, 1971; Gelernter, 1990; Keil, 1991). Son activité est rapide (Gelernter, 1990; Keil, 1991). Il est sécuritaire (Siegel, 2001). Il faut également signaler que la production des insecticides biologiques est beaucoup moins sophistiquée que celle des insecticides chimiques (Who, 1985), les coûts des essais toxicologiques sont généralement plus bas (moins de 500 000 \$ US) et le temps de l'homologation est moindre en comparaison avec les millions de dollars (20 millions de \$ (Silvy et al., 2001)) dépensés et le temps nécessaire pour développer les produits chimiques (Gelernter, 1990; Carlton, 1990).

#### Principaux Facteurs limitant le développement de l'usage des biopesticides

Le biopesticide pourrait ainsi devenir très compétitif particulièrement dans les cas où: 1) le produit fonctionne efficacement dans des conditions non-idéales; 2) il réagit rapidement pour contrôler les ravageurs; 3) il est stable (emmagasinage à long terme), et 4) son rapport coûtefficacité est avantageux vis-à-vis de l'alternative chimique.

Certes, *Bt* possède des caractéristiques qui correspondent aux critères d'efficacité et de sécurité (Abdel-Hameed, 1992). Malgré cela, *Bt* ne représente qu'environ 1% du budget, dans un marché global annuel d'insecticide de 8.1 milliards \$ (Harris, 1997). Les insecticides chimiques occupent une grande place dans le marché mondial des insecticides, soit 12 milliards de \$ US. Le principal facteur qui limite sa production est le coût de production qui dépend surtout des conditions de fermentation utilisées et des coûts du milieu de culture.

#### Milieu de culture et problématique du coût de production de Bt

La production des insecticides chimiques reste encore moins coûteuse que celle des biopesticides (Georgis, 1997). Ceci est particulièrement dû aux coûts reliés aux substrats et aux conditions de fermentation. Selon Dulmage (1981) l'utilisation de Bt est restreinte pour des raisons économiques. La production de Bt dépend de plusieurs facteurs, dont les plus importants sont les coûts reliés aux paramètres de fermentations (aération, agitation, adjuvants, etc.) et les coûts du milieu de culture, qui peut devenir un facteur limitant la production commerciale de Bt (Ejiofor, 1991). Dans le processus conventionnel, et selon la capacité de l'usine qui produit le

biopesticide Bt, le coût de ces ingrédients de fermentation varie entre 35 et 59 % du coût total (The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook, 1993). Selon Lisansky et al. (1993) le coût du milieu est de 14.68 \$ US qui représente environ 7.4% du coût total dans le cas d'une usine qui produit 20 tonnes de Bt par années. Dans le cas d'une usine produisant 200 tonnes par année le coût du substrat est de 5.09 \$ US représentant 20.6% du coût total.

Pour réduire les coûts de production de Bt, plusieurs substrats moins chers ont été utilisés (Ejiofor, 1991; Mummigatti et Raghunathan, 1990). Les sous-produits agricoles ont été souvent choisis comme milieu de culture alternatif (Ejiofor, 1991; Salama et al., 1983 a,b,c; Mummigatti et Raghunathan, 1990). Certains de ces sous-produits sont utilisés avec succès en fermentation industrielle dans plusieurs pays (Mummigatti et Raghunathan, 1990). Ils ont certes montré leur efficacité à supporter la croissance, la sporulation et la production de la  $\delta$ -endotoxine par Bt. Toutefois, leur disponibilité (Chilcott et Pillai, 1985), leur traitement (Ejofor et Okafor, 1989; Mummigati et Raghunathan, 1900) et/ou l'ajout de certains éléments nutritifs afin d'améliorer l'efficacité du biopesticide Bt (Salama et al., 1983 a,b,c) augmentent le coût de production et limitent leur commercialisation.

#### Possibilité d'utilisation des boues résiduaires comme substrat pour la culture de Bt

Différentes études ont montré que *Bt* forme des spores et de l'endotoxine dans presque tous les milieux essayés. Les bioessais réalisés avec différents insectes nuisibles ont démontré aussi que le niveau d'entomotoxicité obtenu en utilisant ces milieux alternatifs est acceptable (Ejiofor, 1991; Salama et al., 1983 a,b,c; Mummigatti et Raghunathan, 1990; Ejiofor, 1991; Obeta et Okafor, 1984). De plus *Bt* produit des protéases extracellulaires; ce qui lui permet d'utiliser une vaste gamme de milieux de culture. Par ailleurs, le substrat doit être disponible et ne doit pas être cher. Il doit également avoir des caractéristiques physico-chimiques lui permettant d'être soluble, de ne pas former des grumeaux et d'être altéré par la stérilisation.

Beaucoup de recherches ont été faites afin de trouver un milieu de culture moins chers pouvant soutenir la croissance de *Bt* et réduire les coûts de sa production lui permettant ainsi d'être commercialiser (Ejiofor, 1991; Mummigatti et Raghunathan, 1990; Salama et Morris, 1993). Les efforts ont surtout porté sur l'utilisation de sous-produits industriels ou agroalimentaires qui sont des substrats économiques localement disponibles. Dans la même perspective, et afin de palier à ce problème, des travaux effectués à l'INRS-ETE ont montré que les boues des stations d'épuration des eaux usées, qui sont très riches en carbone, en azote, en

phosphore et autres nutriments, peuvent être utilisées comme substrat de culture de Bt (Tirado-Montiel, 1997). Il a été démontré que les boues supportent bien la croissance et la sporulation de Bt et que la formation de la  $\delta$ -endotoxine n'est pas affectée (Tirado-Montiel et al., 2001). Ainsi, les boues, déjà utilisées comme engrais, peuvent avoir aussi une grande valeur nutritive pouvant remplacer les produits commerciaux utilisés pour la production du biopesticide Bt.

#### Avantage de l'utilisation des boues résiduaires pour la production de Bt

Les boues produites dans les usines d'épuration des eaux usées créent des problèmes très importants (Couillard et al., 1986). Un des problèmes est lié à l'aspect économique de la gestion des boues car leur traitement et leur élimination finale peuvent représenter jusqu'à 50% du coût total d'opération d'une usine de traitement des eaux usées (Lester et al., 1983; Pahren, 1980). Les quantités de boues produites augmentent sans cesse; il est donc souhaitable de trouver un autre moyen de les recycler. La possibilité d'utilisation des boues pour la production du biopesticide Bt est une autre option pertinente pour le recyclage et la valorisation des boues dans le milieu agroforestier. Des études de Tirado-Montiel (1997) ont montré que Bt croît bien dans les boues de plusieurs stations d'épuration des eaux usées, leur croissance et leur sporulation ne semblent pas être affectées par le nouveau substrat de culture. De même la production de la  $\delta$ -endotoxine, qui est le moteur du pouvoir insecticide de Bt, n'a pas été affectée par l'utilisation des boues.

En somme, l'utilisation des boues des stations d'épuration pour la production de *Bt* va permettre de produire un biopesticide dont les bénéfices obtenus seraient très avantageux car les frais engendrés pour l'obtention des boues sont limités pour le moment à leur transport (Tirado-Montiel, 1997). Par ailleurs, ceci peut avoir double intérêt, économique et écologique. D'une part, la production d'un biopesticide est fortement sollicitée pour le contrôle des insectes nuisibles de façon efficace et sécuritaire en employant les rejets des stations de traitement des eaux usées comme substrat. D'autre part, cela constitue une avenue pertinente dans la gestion des boues et va également ouvrir d'autres horizons d'exploitation des boues en fermentation, (production de protéase ou la fermentation du rhizobium : Projets en développement par l'équipe du professeur R.D. Tyagi (INRS-ETE). Selon Couillard et Grenier (1987), les activités de recherches devraient permettre d'identifier d'autres marchés pour les boues résiduaires.

#### Problème de la production de Bt dans les boues résiduaires

Les premières études réalisées par Tirado-Montiel (1997) qui ont porté sur la comparaison de différents types de boues, l'effet du pH, de l'agitation et des ajouts de nutriments, etc., ne

semblent pas démontrer que la production de Bt par fermentation dans les boues permet d'obtenir des suspensions ayant un potentiel entomotoxique concurrentiel avec le milieu synthétique. Les concentrations maximales des cellules totales et des spores obtenues lors de la fermentation Bt produite dans les boues (les boues utilisées sont celles de la station d'épuration des eaux usées de Jonquière, le pH de 7, l'agitation de 250 rpm et la température entre 30 et 32°C) sont respectivement de  $2.90 \times 10^8$  UFC/ml et  $2.47 \times 10^8$  UFC/ml. L'entomotoxicité maximale atteint presque ( $10500 \text{ UI/}\mu\text{l}$ ) ce qui est faible par rapport à l'efficacité des produits commerciaux qui est généralement de  $12600 \text{ UI/}\mu\text{l}$  après concentration. La concentration des cellules atteinte dans le milieu synthétique, est de l'ordre de  $5\times 10^9$  UFC/ml avec un taux de sporulation de 90%. Il est donc pertinent d'optimiser les différents facteurs pouvant influencer la production de Bt dans les boues.

#### Facteurs pouvant influencer la production de Bt par fermentation dans les boues

Pour mieux intervenir et améliorer la production de *Bt* dans les boues, il importe d'identifier les facteurs qui ont un effet sur la production de *Bt*. Plusieurs facteurs entrent en jeu lors de la production de *Bt* par fermentation dans les boues. Il s'agit, entre autres, de la variété de *Bt* utilisé, de la nature et des caractéristiques du milieu de culture et les conditions de fermentation. Ces facteurs peuvent avoir une influence sur le complexe spores-cristaux produit par *Bt* (Dulmage 1970a; Ejiofor, 1991). Dans certains cas les caractéristiques du milieu peuvent être modifiées par des traitements ou par des ajouts d'éléments nutritifs. Des études de Tirado-Montiel (1997) ont montré un effet bénéfique du traitement des boues et d'ajout de levure sur la performance du biopesticide *Bt*. Les conditions de fermentation, entre autres, la température, le pH, l'agitation et l'aération, peuvent affecter non seulement le potentiel entomotoxique de *Bt*, mais également le coût de production du biopesticide (Halvorson, 1957; Avignone et al., 1992).

D'un autre côté, une faible performance de l'inoculum peut engendrer une importante phase de latence ou une faible croissance de *Bt*. Différents pourcentages d'inoculum ont été testés lors des travaux de Sachdeva (1999) et un optimum a été identifié en vue d'assurer une meilleure performance de *Bt*. Le milieu de préparation de l'inoculum doit aussi faciliter la transition avec le milieu de production finale.

Afin d'augmenter la performance de Bt, il serait également judicieux de tester l'effet d'une double inoculation, cette technique développée dans ce travail pourrait entraîner une

augmentation du nombre de cellules et de spores dans le milieu de culture et par le fait même l'entomotoxicité de Bt.

En somme, les boues constituent un substrat récemment utilisé à l'INRS-ETE pour la production de Bt. Comme je l'ai montré précédemment, le substrat et les conditions de fermentation peuvent avoir un impact sur l'activité entomotoxique de Bt; ce qui m'amène dans cette thèse à procéder à l'optimisation des différents paramètres clés pouvant influencer la croissance et l'entomotoxicité de Bt dans les boues. Cela devrait permettre d'obtenir par rapport au biopesticide commercial un produit concurrentiel au point de vue qualité du produit et du coût de production.

## CHAPITRE 1 APERÇU GÉNÉRAL



# 1 APERÇU GÉNÉRAL SUR LA PRODUCTION DU BIOPESTICIDE À BASE DE *B. THURINGIENSIS*

Depuis plusieurs années, les ressources forestières, les cultures et les récoltes sont protégées contre les maladies parasitaires et les insectes ravageurs qui affectent l'agriculture et la foresterie ou qui sont un moyen de transmission de maladies à l'aide des insecticides chimiques (Ejiofor, 1991). Ces produits sont efficaces, mais leur coût de production est très élevé (Carlton, 1990). La production des insecticides chimiques est sophistiquée; elle nécessite une expertise et des moyens matériels et financiers importants. Les coûts des essais toxicologiques sont élevés et le temps d'homologation est très long (Gelernter, 1990; Carlton, 1990). Les insecticides chimiques présentent également des problèmes de toxicité pour l'environnement (Ejiofor, 1991; Carlton, 1990). En effet, les insecticides utilisés sont responsables de la contamination du sol, de la pollution des eaux de surface et souterraines et de la présence de résidus toxiques dans le sol et dans les aliments (Carlton, 1990). Les insecticides appliqués sur les parties aériennes des végétaux ou en traitement de sol, évoluent quantitativement et qualitativement dans le temps.

Les pesticides chimiques entraînent également un déséquilibre biologique vu qu'elles constituent un moyen de lutte non sélective contre tous les insectes (Fischer, 1993; Carlton, 1990); ce qui limite considérablement leur efficacité (Abdel-Hameed, 1992; Fisher, 1993). Au Québec par exemple, plusieurs études ont montré la présence d'insecticides dans le fleuve St-Laurent et dans ses tributaires (Environnement Canada, 1978). Entre 1980 et 1991, l'analyse des échantillons d'eau des rivières situées dans des régions de culture intensive (Yamaska, Saint-François, etc.) a montré la présence d'insecticides, tels que l'atrazine, le diazinon, à des quantités qui dépassent le seuil de qualité des eaux. La détection croissante de concentrations significatives des insecticides et la préoccupation que cela a engendrée ont particulièrement stimulé la recherche de solutions de rechange aux insecticides chimiques

#### 1.1 Les biopesticides

En période endémique, l'équilibre biologique dans l'écosystème forestier est assuré par les insectes prédateurs, les insectes parasites, les virus, les protozoaires, les champignons et par certaines bactéries. L'exploitation de ce phénomène naturel a amené les chercheurs, depuis de nombreuses décennies, à développer la possibilité d'utilisation de certains micro-organismes entomopathogènes, tels que les champignons, les protozoaires, les virus et les bactéries (*Bt*)

(Aronson et al., 1986; Burges, 1986; Daoust, 1990) comme agents de lutte biologique contre les insectes nuisibles. Cette technique tant efficace que sécuritaire pour l'environnement a fait l'objet d'une recherche intensive dans le monde entier depuis les années soixante (Ejiofor, 1991). Au Canada par exemple, la plupart des traitements aériens des forêts contre les lépidoptères, particulièrement la tordeuse des bourgeons de l'épinette, sont assurées par l'application d'une suspension concentrée de *Bt*. La superficie traitée par *Bt* entre le début des années 80 et la fin de cette décennie a augmenté de 6% à plus de 60% (Frankenhuyzen, 1994).

Des études, entre autres, de Gelernter (1990) et Keil (1991) ont trouvé que l'utilisation de l'insecticide biologique Bt est très spécifique aux insectes qui sont sensibles à ce dernier. Ce qui permet en même temps de protéger les autres êtres vivants non ciblés par le traitement et qui ne sont pas nuisibles, comme les poissons, les oiseaux ou les mammifères. Il est également important de signaler que les produits agricoles traités avec Bt ne sont pas dangereux pour la santé humaine ou animale. En effet, Bt a été utilisé pendant trois décennies pour protéger des cultures de céréales, d'arbres, des graines entreposés, sans avoir aucun danger pour les consommateurs ou les animaux (Meadows, 1990). Bt est biodégradable et n'a pas d'effets polluants par rapport à l'environnement (Gelernter, 1990). Récemment, des études, déposées au Comité de santé environnementale du Québec et au ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, n'ont pas permis de découvrir des effets néfastes de Bt sur la santé humaine et animale. L'ensemble des ingrédients entrant dans la composition des produits à base de Bt ne sont pas toxiques aux doses utilisées sur le terrain (Lessard et Bolduc, 1996).

Plusieurs agents de lutte biologique ont vu le jour jusqu'à présent. Pour qu'ils puissent faire l'objet d'une exploitation, ils doivent présenter, au moins, les mêmes avantages que les procédés déjà existants : 1) efficacité et fiabilité, lorsque les conditions d'usage sont compatibles avec le contexte agro-économique de la cible; 2) maîtrise d'une technologie de production et de distribution; 3) peu de risques potentiels pour l'environnement; 4) rentabilité suffisante pour justifier la commercialisation.

#### 1.1.1 La bactérie B. thuringiensis

#### 1.1.1.1 Généralités

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie gram positif, aérobie, isolée pour la première fois par Ishiwata en 1903, chez des larves du ver à soie (Bombyx mori). Elle a été ré-isolée en 1911

par Berliner à partir de larves malades de la Pyrale méditerranéenne de la farine (Ephestia Kühniella) et fut nommée *Bacillus thuringiensis* (du nom de la ville où le bacille a été découvert). Elle peut être présente naturellement dans plusieurs habitats ou organismes (eau, sol, plantes ou insectes) (Chaufaux et al., 1997). La première suspension commerciale de la bactérie *Bt* a, en effet, été produite avant la seconde guerre mondiale (Steinhaus, 1963), mais c'est la découverte du sérotype *Bt* kurstaki HD-1 dans les années 70 qui en a fait un véritable succès commercial (Lisansky et al., 1993; Rowe et Margaritis, 1987; Daoust, 1990). D'autres variétés ont été découvertes par la suite. Entre autres, le sérotype *Bt* var. israelensis, souche extrêmement toxique pour les diptères, a été isolée en Israël (Goldberg et Margalit, 1977). Quelques années plus tard, *Bt* var. tenebrionis actif contre certains coléoptères a été découvert par des chercheurs allemands (Krieg et Miltenburger, 1983). L'application de *Bt* comme insecticide, avec un dosage suffisant, peut être efficace pour contrôler certains insectes nuisibles.

Actuellement Bt est l'entomopathogène le mieux connu et le plus utilisé. Bt est une bactérie sans une grande exigence nutritionnelle. Elle croît très bien en surface d'Agar ou submergé dans une solution nutritive. Elle est également facile à manipuler par les méthodes de microbiologie ou en utilisant des techniques de fermentation pour une production à grande échelle. Bt est la seule espèce bactérienne insecticide dont la commercialisation atteint une échelle relativement importante. Elle est utilisée avec efficacité depuis de nombreuses années pour combattre sélectivement plus de 600 espèces d'insectes.

L'activité entomopathogène de Bt est liée à la présence d'une inclusion protéique de structure cristalline constituée par l'assemblage de sous-unités polypeptidiques, de taille variable selon les souches, appelées  $\delta$ -endotoxines. Le cristal protéique est synthétisé au cours de la sporulation et représente, à la fin de processus, environ 25% du poids sec de la bactérie.

On distingue 84 sérotypes de *Bt* dont certains ont des propriétés toxiques pour des insectes bien spécifiques. Les préparations de *Bt* basées sur la sporulation des cultures sont principalement limitées pour un groupe taxonomique d'insectes donnés (Tableau1.1).

Tableau 1.1 : Variétés de Bt avec les types d'insectes pouvant être contrôlés

Variétés de <i>Bt</i>	Types d'insectes contrôlés par Bt			
Var. thuringiensis (sérotype H-1)	Larves de Lépidoptères (utilisation interdite)			
Var. kurstaki (sérotype H-3a, 3b)	Larves de Lépidoptères			
Var. aizawai (H-7) Var. israelensis (sérotype H-14)	Larves de Lépidoptères et Diptères			
Var. tenebrionis (sérotype 8a8b)	Larves de Diptères (moustiques et mouches noires)  Larves de quelques Coléoptères			

#### 1.1.1.2 Croissance et métabolisme de Bt

Bt est une bactérie chimio-hétérotrophe, elle tire son énergie de source chimique durant sa phase de croissance végétative. La croissance de Bt peut être décrite en trois phases: 1) végétative, 2) de transition et 3) de sporulation (Tirado-Montiel et al., 1998). Durant la phase végétative Bt catabolise les carbohydrates, les acides aminés (Rowe, 1990); elle peut également utiliser les glucides comme source de carbone (Rowe et Margaritis, 1987). On obtient finalement une accumulation de produits métabolites: Le pyruvate, l'acétate, poly-β- hydroxybutyrate et 2,3-butanodiole (Anderson, 1990; Rowe, 1990); ce qui provoque une diminution du pH. Les carbohydrates, les acides aminés, ainsi produits vont être ensuite utilisés comme source d'énergie pour les spores et la maturation du cristal protéinique, ainsi que pour la lyse cellulaire (Tirado-Montiel et al., 1998). Les Pyruvates et les acétates, quant à eux, sont oxydés au début de la sporulation (Hanson et al., 1964). La consommation des acides en cette phase entraîne une augmentation du pH qui peut atteindre 8 à la fin de la sporulation et la lyse de la cellule (Benoît et al., 1990; Morris et al., 1996).

Le mécanisme de l'utilisation de l'azote par Bt est complexe et n'est pas encore bien connu. L'azote peut être assimilé sous forme de  $NH_4^+$  par Bt durant la phase de croissance végétative (Borris et Aronson, 1969; Aronson et al., 1975; Aronson, 1976) et qui sera utilisé durant la sporulation pour produire des métabolites secondaires comme les enzymes spécifiques à la sporulation et le cristal protéinique (Avignone-Rossa et Mignone, 1995). L'oxygène est un élément important durant la croissance de Bt. Celle-ci l'utilise comme accepteur d'électrons pour oxyder les métabolites de la fermentation et les transformer en  $CO_2$ .

Au début de la croissance de *Bt* on peut assister à une grande phase de latence, cette période est particulièrement influencée par la quantité d'inoculum, l'âge de la préculture et la composition du milieu (Wayman et Parekh, 1990). Le taux de croissance de *Bt* dépend de la température, du pH, et de la composition du milieu de culture (Pelzcar, 1993).

#### 1.1.1.3 Sporulation de B. thuringiensis

B. thuringiensis fait partie des bactéries sporulantes. Elle produit des spores qui entrent en état de 'dormance' caractérisé par une faible activité métabolique qui empêche tout développement cellulaire. L'état de dormance est généralement favorisé par une température et un pH stable (Gould, 1969). Les spores formées à l'intérieur de la cellule sont appelées 'endospores'. Les spores sont uniques et varient selon leurs formes et leurs positions dans la cellule. Elles sont très résistantes à la chaleur, aux changements environnementaux, au traitement ultrasonique et à la dissication. Cette résistance est particulièrement due aux multiples couches protéiniques qui les protègent de la déshydratation (Pelmont, 1993). La formation de la spore et de ces différents éléments structuraux nécessite la présence d'éléments organiques et inorganiques en quantité suffisante, comme le phosphore, le calcium, le magnésium et le manganèse.

#### 1.1.1.4 Production de la $\delta$ -endotoxine

A la fin de la sporulation et suite à la lyse du sporange bactérien, il y a libération des spores entourées de leur exosporium et des cristaux (Figure 1.1) contenant la  $\delta$ -endotoxine qui contient à son tour des séquences protéiques qui sont toxiques pour divers insectes (Valéro, 1990). Cette dernière n'est pas produite si les conditions favorisant la sporulation ne sont pas présentes (Ribier et al., 1981).

La toxine est constituée par différents polypeptides dont la synthèse est régie par des gènes Cry plasmidiques ou chromosomiques. Ces gènes sont généralement situés sur des plasmides variant de 50 à 225 Kd (Carlton et Gonzales, 1984). L'arrangement spatial des polypeptides permet également de définir la structure cristalline des inclusions parasporales qui est selon la variété ou la souche, bipyramidal, cuboïde ou composite.

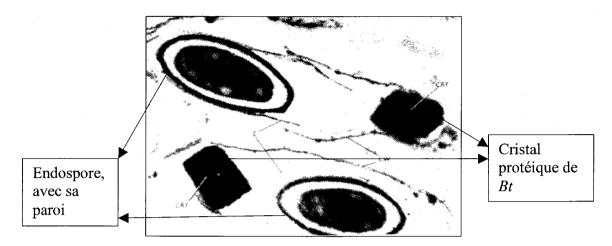


Figure 1.1: Des spores de Bt et de  $\delta$ -endotoxines cristallisées (Institut Pasteur, photo Jacques Ribier).

Bt peut synthétiser au moins sept toxines différentes sous le contrôle de gros plasmides. On trouve, entre autres, α-exotoxine (lécithinase C), une exotoxine thermo-stable (β-exotoxine), le cristal parasporal protéique (δ-endotoxine). Les α-exotoxines et les β-exotoxines s'accumulent pendant la phase de croissance exponentielle de certaines variétés et ne peuvent être employées dans la lutte biologique à cause de leur effet tératogène (Rowe et Margaritis, 1987). Les δ-endotoxines sont celles qui donnent le pouvoir entomopathogène à Bt. Selon Krieg et Miltenburger (1983) et Gill et al., (1992), trois pathotypes peuvent être distingués: 1) le pathotype A ou Btk, produit généralement un cristal bipyramidal, parfois de forme circulaire. Le PM total de la toxine est en général de 135 Kd. La dissolution du cristal en contact avec le pH basique (9-10) et les enzymes intestinaux de l'insecte cible produit des fragments toxiques; 2) le pathotype B ou Bti, produit un cristal dont la forme est généralement irrégulière et composée de trois types de fragments dont les PM sont de 128 à 135 Kd (Ward et Ellar, 1987) et de 27 Kd (Waalwijik, 1985); 3) le pathotype C (Bt var. tenebrionis). Le cristal est de forme carrée et large de PM 67 Kd (McPherson et al., 1988).

Aujourd'hui, plusieurs toxines ont été répertoriées (Tableau 8.46 annexes). Leurs gènes sont portés par des plasmides ou par des chromosomes (Lereclus et al., 1989). Ces protéines ont suffisamment d'homologies permettant de penser qu'elles ont un mode d'action similaire. Or, les récepteurs membranaires des cellules épithéliales sont différents (Van Rie et al., 1990). Beaucoup

d'études et de recherches exploitent actuellement les gènes de *Bt* dans des organismes consommés par les insectes (Freitelson et al., 1992). C'est, par exemple, le cas des plantes transgéniques. La transgénèse permet d'introduire de nouveaux gènes dans des plantes plus rapidement que par sélection classique d'individus issus de croisements. Une fois intégrés dans le génome de la plante, les transgènes seront transmis à leur descendance, exactement au même titre que tous les autres gènes. Ceci dans le but, notamment, d'augmenter les rendements ou encore rendre une plante plus résistant à un organisme nuisible comme un insecte ravageur ou une maladie. Le maïs *Bt*, par exemple, contient un gène provenant de *Bt* qui produit un insecticide pouvant combattre la pyrale. Par ailleurs, il importe de mentionner que certains organismes pourraient intégrer ce gène dans leur bagage génétique et ainsi développer leur propre résistance.

D'autres recherches de manipulation génétique méritent d'être mentionnées : par exemple, la formation du cristal protéinique pendant la sporulation est codée par des gènes qui font l'objet actuellement de travaux de manipulation génétique afin d'améliorer la production du cristal protéinique (Mettus et al., 1990).

#### 1.1.1.5 Mode d'action de B. thuringiensis contre les insectes

Le mode d'action de *Bt* varie selon l'insecte cible et la souche bactérienne utilisée. Après ingestion du cristal protoxique par des larves de Lépidoptères, l'endotoxine libère des séquences protéiques, par hydrolyse enzymatique en milieu alcalin (pH=9, 10). Cette solubilisation entraîne une rapide dégénérescence de l'épithélium intestinal des larves (Lecadet, 1965; Luthy, 1980 et Tyrell et al., 1981) (Figures 1.2). Ces altérations aboutissent à une étape finale qui est la lyse cellulaire et ainsi à la mort de l'insecte cible. Larget et De Barjac (1981) et Charles (1983) montrent que, malgré la différence de la morphologie et de la chimie du cristal chez les diverses variétés de *Bt*, des effets cyto-pathologiques similaires sont observés chez les Diptères et les Lépidoptères. Des études de Knowles et al. (1989) et de Van Rie et al. (1990) montrent que l'existence d'une liaison entre la toxine et des récepteurs au niveau du tube digestif des insectes entraîne la formation de pores dans la membrane cellulaire, ce qui provoque un déséquilibre ionique du milieu intracellulaire facilitant par la suite la lyse de la cellule. Il est important de signaler également que les spores, en germant dans l'hémolymphe, causent chez l'insecte sensible une septicémie mortelle. La mort de l'insecte survient habituellement au bout de 24 à 48 heures après l'ingestion des cristaux.

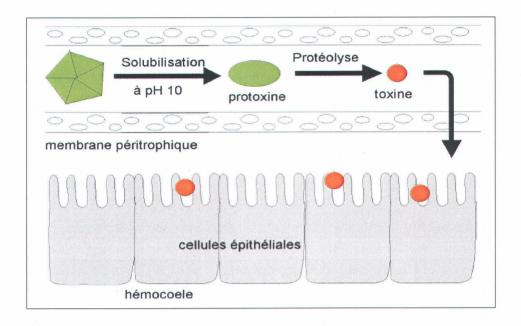


Figure 1.2 : Mode d'action des séquences protéiques dans l'épithélium intestinal des larves de Lipidoptères (Sanchis et al., 1996)



Figure 1.3 : Tordeuses des bourgeons de l'Épinette, du même âge (Centre de Foresterie des Laurentides, Ressources Naturelles Canada)

La Figure 1.3 montre que les larves traitées avec *Bt* sont plus petites que celles non traitées, pour le même âge. Cela est dû au fait que l'ingestion de *Bt* entraîne un arrêt de l'alimentation des larves. Au bout de 48 heures, plus de 95 % des larves sont mortes (Vincent et Coderre, 1992).

#### 1.1.1.6 Identification et caractérisation de B. thuringiensis

Les méthodes utilisées pour caractériser les souches de cette bactérie entomopathogène sont basées sur:

- Les caractères morphologiques de Bt, en particulier la formation de spores et de cristaux;
- Les critères biologiques produisant des réactions biochimiques spécifiques;
- La présence d'antigènes flagellaires spécifiques; jusqu'à présent, l'analyse sérologique est considérée comme le procédé le plus fiable pour identifier les sous-espèces de *Bt*;
- Les caractéristiques génétiques de *Bt*, principalement des séquences spécifiques des acides nucléiques (ADN et ARN).

Dans ce domaine, la méthode la plus performante est basée sur l'amplification en chaîne (Polymerase Chain Réaction, PCR) de courtes séquences spécifiques d'ADN permettant de détecter la présence des gènes Cry codant les protéines toxiques. Le procédé PCR-Multiplex a été raffiné en choisissant des amorces spécifiques pour différents gènes Cry, ce qui permet d'identifier les sous-espèces de *Bt*. La méthode PCR multiplex, combinée à certains tests biochimiques, est actuellement la technique la plus efficace pour caractériser de nouvelles souches de *Bt*.

## 1.2 Les boues des stations d'épurations des eaux usées : un substrat prometteur pour la culture de Bt

Les boues générées par les stations de traitement des eaux usées constituent un problème environnemental quant à leur élimination surtout après la mise en œuvre des programmes d'assainissement par les gouvernements des provinces canadiennes. Cette situation a conduit à la mise sur pied de programmes plus adéquats d'assainissement des eaux usées municipales. Au Québec, après l'implantation du Programme d'Assainissement des Eaux du Québec (PAEQ), la quantité des boues d'épuration produite a augmenté, elle est estimée actuellement à environ 125 000 tonnes de matières sèches par année (tbs/an). Au Canada, en 1981, environ 48 % de la population canadienne bénéficiaient de stations d'épuration des eaux usées (Webber, 1988). Depuis ce temps, ce pourcentage subi une hausse significative en raison du PAEQ. Au Canada, on estime la production de boues à 1 million de tonnes de matière sèche à la fin du siècle (Tyagi et Couillard, 1989). Ces grandes quantités de boues ont provoqué un problème de gestion auquel il est

impératif de trouver des solutions. Leur traitement et leur élimination présentent des impacts économiques et sanitaires importants. Pendant le traitement des eaux usées, le volume des boues générées représente 1% du volume de l'eau traitée, avec un contenu en solides variant de 1 à 7% (W/V) (Degrément, 1989). Le coût total, estimé à 50 % du traitement des eaux usées, est destiné au traitement et à l'élimination finale des boues générées. Au cours de la stabilisation, les boues subissent un autre traitement de nature thermique, chimique ou biologique pour obtenir des boues digérées. Ces étapes nécessitent des dépenses importantes.

Conventionnellement, il existe deux tendances de gestion des boues : le recyclage et l'élimination. Les boues peuvent être utilisées comme engrais organiques en milieu agricole ou être incinérées ou enfouies dans des sites spécifiques ou encore jetées à la mer. Cette dernière pratique est maintenant bannie pour certaines régions du monde. Au Canada, on discute de l'acceptabilité des méthodes d'incinération et d'enfouissement. L'incinération des boues est une procédure très coûteuse et les cendres générées peuvent contenir des concentrations élevées en métaux. Les inconvénients de l'enfouissement des boues sont, entre autres, le coût élevé de la gestion et la perte de la biomasse qui peut être utilisée comme source de N, P, K et d'autres nutriments. La valorisation des boues en agriculture et en foresterie qui permet de tirer profit de leur valeur fertilisante (Mostaghimi et al., 1992, Couillard et Grenier, 1987) est un moyen de recyclage des boues. Le Gouvernement du Québec (Gouvernement du Québec, 1983), celui du Canada (Environnement Canada, 1985) encouragent le recyclage comme pratique de disposition des boues. La valeur fertilisante des boues est connue depuis toujours. En effet, les boues peuvent, sur une base de matière sèche, contenir de 3 à 5% d'azote, de 1 à 3% de phosphore (Wong et Henry, 1984) et 30% du carbone (Couillard et Grenier, 1989). D'autres éléments qui normalement sont recyclés par les microorganismes comme macro et micro nutriments, peuvent être rencontrés dans les boues des usines de traitement des eaux usées (Qasim, 1982). Au Canada, en 1981, 29 % du volume total de boues d'épuration produites a été employé à des fins agricoles, alors que 37 % a été disposé par enfouissement (Webber, 1988).

Les boues sont riches en éléments nutritifs. Elles sont formées d'eau, de matières organiques (des protéines, des hydrates de carbone, etc.) et inorganiques (les chlorures, les sels minéraux (calcium, magnésium et potassium), le phosphore, l'azote, le soufre, des ions métalliques) de différentes tailles ainsi qu'une population microbienne très variée. Ce qui constitue un substrat propice pour la croissance et la sporulation de *Bt* (Tirado-Montiel, 1997), permettant ainsi de

développer un nouveau moyen de recyclage des boues. Le volume et les caractéristiques des boues varient selon l'origine (municipal ou industriel) et le type de traitement donné à l'eau résiduaire (primaire, secondaire ou digéré). En effet, les boues primaires sont obtenues principalement du décanteur primaire et les solides qu'elles contiennent sont d'origine minérale et organique. Le pourcentage de matières sèches n'excède généralement pas 5%. Les boues secondaires proviennent du bassin d'aération et du décanteur secondaire, elles sont formées de flocs bactériens qui à leur tour sont constitués de micro-organismes vivants ou morts, de particules organiques, de colloïdes organiques et de débris de cellules lysées. De 70 à 80% des matières en suspension correspondent aux matières volatiles en suspension (MEVS) (Roques, 1979). L'utilisation de ces variétés de boues serait d'une très grande importance afin de trouver le milieu propice pour une production plus efficace de *Bt* (Tirado-Montiel, 1997).

#### 1.3 Facteurs pouvant influencer le potentiel entomotoxique de Bt

En plus de la variété de *Bt* utilisée, qui peut avoir un effet sur l'activité entomotoxique (Dulmage, 1970a), la composition du milieu de culture et les conditions de fermentation peuvent avoir une influence sur la production du complexe spores-cristaux par *Bt* (Dulmage, 1970a). C'est ce complexe qui produit l'effet entomopathogène de *Bt* sur l'insecte cible.

#### 1.3.1 Milieu de culture et son impact sur la production de Bt

À cause du coût élevé de production de *Bt* dans les pays en voie de développement, des recherches sont en cours afin de produire le biopesticide *Bt* avec une haute toxicité et au moindre coût (Salama et Morris, 1993). *Bt* est une bactérie qui peut croître dans différents milieux malgré que ces besoins physiologiques varient selon le type (Dulmage et al., 1990). Ce qui rend difficile la standardisation d'un milieu de culture. Selon Mummigati et Raghunatan (1990) et Obeta et Okafor (1984), la composition du milieu peut avoir une influence sur la croissance, la sporulation et la production d'endotoxine. Mais dans tous les cas, un milieu de culture doit contenir les éléments adéquats pour permettre une bonne croissance et une bonne sporulation de la bactérie. Selon Liansky et al. (1993), *Bt* a besoin d'eau, des sources de carbone et d'azote ainsi que des minéraux pour se développer dans des conditions de pH, de température et d'aération appropriées, des conditions favorables pour sa croissance.

La culture commerciale de Bt se fait dans des milieux contenant une source d'azote, de carbone et d'extrait de levure ou de protéines pour palier au besoin en acides aminées. Le but

dans une culture industrielle est d'atteindre des taux de croissance très élevés qui permettent d'obtenir des concentrations cellulaires importantes et un taux de sporulation également élevé. Cela n'est pas toujours facile à atteindre, car si on met une grande quantité de substrat carboné, on obtiendrais une concentration élevée des cellules, mais la sporulation sera tardive. Donc il faut chercher les conditions optimales de croissance et de sporulation. Les souches de Bt sont, en général, auxotrophes; donc les milieux de cultures utilisés doivent contenir un sucre et de l'extrait de levure ou des protéines pour palier au besoin en acides aminées. Cependant, Bt est producteur de protéinases exo-cellulaires qui peut jouer un rôle important dans la croissance de Bt.

Les principales sources d'azote employées dans la production commerciale de *Bt* sont la levure de bière, la farine de soja, de poisson, de maïs, de riz, etc., tandis que le glucose, le sucrose, les mélasses et l'amidon sont employés comme source de carbones. Les milieux de culture sont enrichis avec de l'extrait de levure et des sels de potassium, du calcium, du manganèse, du zinc et du fer qui sont des facteurs importants pour la croissance, la sporulation et la production de δ-endotoxine chez la bactérie (Lisansky et al., 1993; Bernhard et Utz, 1993; Black et Snyman, 1991). Selon Arcas et al. (1984), le potassium, le calcium, le manganèse et le magnésium peuvent influencer la production de l'endotoxine. Les sels de phosphates doivent être utilisés en grandes quantités, car ils jouent le rôle de tampon. Il faut signaler que plusieurs études ont été réalisées sur la biochimie et la toxicité de *Bt* (Valéro et al., 1999; Xiao-ming et Wang, 1998). De même des études de Bernhard et Utz (1993) ont monté que la présence de certains ions métalliques comme le cuivre, le fer, le cobalt et le zinc dans le milieu de culture est nécessaire.

La concentration des solides totaux dans le milieu de culture est un paramètre clé qui peut avoir un effet sur la concentration des éléments nutritifs dans le milieu de culture. Ce qui peut avoir un effet sur la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine. Des études de Skidar et al. (1991) ont montré que la concentration optimale des différents minéraux peut varier selon la variété de *Bt*. De même, des études de Pearson et Ward (1988) utilisant différentes sources de carbone (du glucose, des mélasses et de l'amidon) et différentes concentrations, ont montré que les niveaux d'entomotoxicité varient dans les complexes spores-cristaux produits par *Bti*. Il est donc important de trouver les concentrations adéquates pour chaque milieu de culture, afin d'obtenir un meilleur potentiel entomotoxique. Des études de Scherrer et al. (1973) ont montré qu'il existe la concentration optimale des sources de carbone qui permettent d'éviter des conditions pouvant inhiber la croissance de la bactérie.

La concentration des solides totaux dans le milieu de culture peut avoir également un effet sur le transfert d'oxygène. Il faut donc trouver la concentration des solides totaux dans le milieu de culture qui permet une bonne aération du milieu, ceci dans le but d'éviter une faible entomotoxicité. En effet plusieurs études ont montré la relation entre la concentration de O2 dans le milieu de culture de *Bt* dans des bioréacteurs et la sporulation et la production d'endotoxine (Avignone-Rossa et al., 1992). Des études de Pearson et Ward (1988) ont montré que la phase de sporulation nécessite une forte concentration de l'oxygène de plus la δ-endotoxine et diminue sous des conditions d'oxygénation limitée (Rossa et al., 1992).

Comme cela a été déjà souligné, l'utilisation des biopesticides est restreinte pour des raisons économiques. Le milieu de culture constitue un obstacle à une commercialisation concurrentielle aux pesticides chimiques. La réutilisation de sous-produits reste une alternative qui est sujette à plusieurs recherches. Récemment, des études ont montré que les boues des stations d'épuration, qui sont, d'une part, riches en éléments nutritifs et d'autre part, disponibles à moindre coût, ont montré leur efficacité dans la culture de *Bt* (Tirado-Montiel, 1997).

#### 1.3.2 Les conditions de fermentations et son effet sur la production de Bt

Bt est une bactérie qui se développe bien à des températures de l'ordre de 26 à 30 °C et à des pH variant de 6.5 à 7.5 avec une très bonne assimilation des sources carbonées. La température, le pH, l'aération, l'agitation sont tous des facteurs pouvant influencer l'entomotoxicité de Bt. Dans la littérature, les études sont axées particulièrement sur deux variétés : aizawai et israelensis. Huber et Lüthy (1987) montrent dans leurs recherches que des pH et des températures extrêmes affectent l'activité insecticide en détruisant la structure des protéines du cristal. Le pH doit être maintenu autour de la neutralité.

Comme tout processus biologique, la croissance et la sporulation de *Bt* dans des conditions aérobies sont fortement influencées par la température. L'activité cellulaire peut être totalement inhibée à des températures basses. Des études de Nishitsutsuji-Uwo (1977) ont montré que l'activité des protéines du cristal peut se voir diminuer à des températures faibles.

Les taux d'aération et d'agitation peuvent également constituer un obstacle au développement des micro-organismes aérobies. De plus, la demande en oxygène varie souvent selon le milieu de culture et ses caractéristiques physico-chimiques, la souche utilisée et l'étape de croissance. Pour la production maximale d'endotoxine, les *Bacillus* nécessitent une forte

demande en oxygène lors de la sporulation. Une toxicité plus élevée est obtenue dans des cultures de Bt réalisées sous un bon niveau d'aération (Dulmage et al., 1990). Le mécanisme de synthèse des toxines est en effet inhibé sous des conditions d'anaérobies (Avignone-Rossa et al., 1992). Des expériences réalisées avec Bt variété israelensis ont montré que sous des conditions de limitations d'oxygène, la croissance, la sporulation et la production de la  $\delta$ -endotoxine étaient inférieures à celles obtenues sans limitation d'oxygène (Avignone et al., 1992). De même, une forte agitation et une forte aération peuvent avoir un impact négatif sur la production d'endotoxine (Moraes et al., 1980; Tirado-Montrel, 1997). Il est donc important de fournir une bonne aération pendant la croissance et la sporulation de Bt et toute situation d'anaérobie est à éviter.

#### 1.3.3 Effet de l'inoculum

Selon Sachdeva et al. (2000), l'inoculum est un paramètre clé dans la culture de souches microbiennes comme Bt, il peut influencer la croissance, la sporulation et la production de la  $\delta$ -endotoxine. Au début de la croissance de Bt on peut assister à une grande phase de latence, cette période est particulièrement influencée entre autres, par la quantité d'inoculum et l'âge de la préculture (Wayman et Parekh, 1990). Donc, il est important d'utiliser la quantité d'inoculum optimum afin d'assurer une bonne croissance de Bt.

Le problème d'une grande phase de latence ou d'une culture bactérienne qui se développe lentement a été rapporté dans la littérature. D'après Hockenhull (1980), le milieu de préparation de l'inoculum doit fournir une interaction avec le milieu de production finale. Cette interaction est cruciale dans le développement de l'inoculum, le transfert devrait être fait entre des milieux similaires ou identiques. Il faut donc s'assurer de la bonne performance de l'inoculum. Cette performance est jugée par son efficacité à accomplir sa tâche finale, particulièrement sa reproductibilité, dans des conditions bien spécifiques (Calam, 1976).

## 1.4 La double inoculation : une nouvelle technique permettant d'améliorer la croissance de Bt et le potentiel entomotoxique

Ces dernières décennies, beaucoup d'efforts ont été déployés pour d'améliorer la production de *Bt* du point de vue coût et efficacité. En effet, le prix des insecticides biologiques reste encore plus élevé que celui des agents chimiques, ce qui réduit leur utilisation (Georgis, 1997). Afin

d'améliorer la croissance et la sporulation de *BAT* et ainsi obtenir un produit concurrentiel par rapport au biopesticide commercial, différents procédés et techniques ont été utilisés.

#### 1.4.1 Utilisation de sous produits agro-industriels

La réduction du coût de production des biopesticides continue d'être une préoccupation majeure dans le domaine de la recherche. Ainsi, plusieurs études ont porté sur l'utilisation des sous-produits agro-industriels, qui peuvent constituer un milieu de culture intéressant pour atteindre cet objectif. On peut citer comme exemples la levure de bière usée (Ejiofor, 1991), les sous-produits des usines de production comme le petit lait, le sirop de maïs, le son de blé, la levure de fourrage, la farine de poisson, les extraits de pomme de terre (Ejiofor, 1991; Salama et al., 1983 a,b,c; Mummigatti et Raghunathan, 1990). Malgré que ces milieux de culture aient montré leur efficacité à supporter la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine par Bt, certaines limitations constituent une barrière à l'expansion de leur utilisation : 1) l'ajout de certains éléments nutritifs afin d'améliorer l'efficacité du biopesticide Bt peut soit limiter la production de Bt, soit augmenter les coûts de production de Bt (Salama et al., 1983 a,b,c,); 2) les pré-traitements de certains sous-produits, par exemple, l'élimination des gras, le réchauffement, le séchage, la concentration (Ejiofor et Okafor, 1989; Chilcott et Pillati, 1985; Munnigatti et Raghunathan, 1990) augmentent le coût de production; c'est le cas de l'utilisation de la farine de certaines légumineuses ou de soja mélangé avec de l'amidon ou de la mélasse pour la production de Bt en Inde (Mummigatti et al., 1990).

#### 1.4.2 Utilisation de techniques d'enrichissement

Des techniques d'enrichissement du milieu de culture par l'extrait de levure, des sels de potassium, du calcium, du manganèse, du zinc et du fer ont été également réalisées afin d'améliorer la croissance, la sporulation et la production de δ-endotoxines chez la bactérie (Lisansky et al., 1993; Bernhard et Utz, 1993; Black et Snyman, 1991). Selon Ejiofor (1991), Obeta et Okafor (1984), Ejiofor et Okafor (1989), on additionne à des sous-produits agroalimentaires certains éléments nutritifs afin d'améliorer la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine. À titre d'exemples, on peut citer le glucose, l'extrait de levure, des graines de légumineuses comme source de protéine (graines de soja, arachides, pois, fèves de Lima, haricots de Soissons) et des sels minéraux (CaCO<sub>3</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> et CuSO<sub>4</sub>). Pearson et Ward (1988), en utilisant différentes sources de carbone (du glucose, des

mélasses et de l'amidon) à différentes concentrations, ont trouvé que les niveaux d'entomotoxicités ont varié dans les complexes spores-cristaux produits par *Bt* variété *israelensis*. Scherrer et al. (1973) ont trouvé également que la dimension, la quantité de protéines et le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux pouvaient varier selon la concentration de glucose dans le milieu.

#### 1.4.3 Utilisation de différentes sérotypes de Bt afin d'améliorer sa toxicité

Le prix des suspensions de *Bt* dépend en partie du niveau de production de la δ-endotoxine lors de la fermentation des sérotypes (Salama et al., 1983). Selon ces mêmes auteurs, l'activité entomotoxique peut varier selon la variété de *Bt* et l'insecte cible utilisé. Pour cela, plus de 82 variétés de *Bt* ont été caractérisées génétiquement. Selon Pearson et ward (1988), différentes souches de *Bt* ont été testées pour améliorer l'entomotoxicité dont les plus utilisés actuellement comme insecticides microbiens sont : *Bt var. kurstaki* (*Btk*), *Bt. Var. israelensis* (*Bti*), *Bt var. tenebrionis* (*Btt*). D'autres *Bt* sont homologués tels que *Bt var. aizawai*, *Bt var. galleriae* et *Bt var. japonensis*. Des études de Chaufaux et al. (1997) ont montré que l'on peut isoler des souches de *Bt* (1260 souches de 4887 échantillons) de différents biotopes. Ces souches avaient une activité insecticide contre des Lépidoptères, contre des Coléoptères, alors que peu d'entre elles ont été actives contre les Diptères.

#### 1.4.4 Optimisation des conditions de fermentation

Comme je l'ai déjà signalé, les conditions de fermentation peuvent avoir une influence sur le complexe spores-cristaux produit par *Bt* (Dulmage, 1970) notamment le pH, la température et l'aération. Le pH recommandé pour une bonne croissance de *Bt* varie de 6.5 à 7.5. Au delà de 7.6 (Halvorson, 1957) et au deça de 6 (Morris et al., 1996), la sporulation des bactéries est réduite. Pour le contrôle du pH, on peut ajouter des solutions tampons ou de l'acide/base dans le milieu de culture (Dulmage et Rhodes, 1971). La sporulation, comme la croissance, est affectée par la température. La température de croissance des bactéries sporulantes oscille généralement autour de 30°C (Murrell, 1961). Les recherches d'Avignone et al. (1992) ont montré que la croissance de *Bt* et son entomotoxicité sont également affectées par l'aération. Une faible oxygénation réduit le taux de sporulation (Halvorson, 1957), un fort taux d'aération est donc nécessaire. Cela peut par ailleurs entraîner une hausse des coûts de production.

De plus, lors d'une production de *Bt*, il est bien démontré que la quantité de l'inoculum influence directement le rendement en termes de nombre de cellules, de nombre de spores et d'entomotoxicité, ceci étant dû à une longue phase de latence et à une faible croissance de *Bt* (Calam 1976, Hockenhull 1980, Lachhab et al., 2001). Afin de favoriser le développement de l'inoculum, il faut aussi que le milieu de préculture et le milieu de production finale soient similaires ou identiques (Hockenhull, 1980, Lachhab et al., 2001).

Récemment, plusieurs études ont été réalisées à l'INRS-ETE visant l'amélioration de la production de Bt dans les boues des stations de traitement des eaux usées. Ces dernières ont porté sur différents types de boues (Tirado-Montriel, 1998 et 2001), sur les facteurs pouvant influencer la sporulation et la production de  $\delta$ -endotoxine comme la température, le pH, l'agitation, l'aération, la concentration des solides totaux et l'inoculum (Sachdeva et al., 1999, 2000, Lachhab et al., 2001). D'autres études ont également porté sur l'effet de la mousse et du rapport C/N sur la croissance et la sporulation de Bt (Vidyaarthi et al., 2000 et 2001). Dans cette même perspective et afin de remédier à certains problèmes de faible croissance et de sporulation, j'ai développé une nouvelle technique d'inoculation 'double inoculation' dont le principe va être décrit dans la section suivante.

#### 1.4.5 Principe de la double inoculation

Au cours de la fermentation, Bt produit des amylases et des protéases, ce qui la rend capable d'utiliser une gamme étendue de substrat (Bernhard et Utz, 1993). Comme cela a été déjà noté, les boues des stations de traitement des eaux usées peuvent être utilisées comme substrat de culture de Bt (Montiel, 1997). Ces boues sont riches en éléments nutritifs et peuvent supporter la croissance d'un deuxième inoculant. Ceci a été confirmé par l'étude que j'ai menée sur la croissance de Bt dans le surnageant. Cette étude préliminaire a permis de constater qu'après 24h de fermentation le surnageant supporte non seulement la croissance de Bt, mais permet également d'atteindre une certaine entomotoxicité non négligeable. L'utilisation d'un inoculant très riche en cellules peut entraîner une forte demande en oxygène en phase de croissance exponentielle. Cette exigence entraîne des répercussions sur la sporulation et la production de  $\delta$ -endotoxine, puisque l'oxygène est un facteur limitant de ce phénomène (Halvorson, 1957). En fait, l'étude de l'éffet du pourcentage de l'inoculum sur la croissance et la sporulation de Bt ainsi que l'étude de l'évolution de la concentration de  $O_2$  dans le milieu de culture en fermenteurs permettent de

constater un faible potentiel entomotoxique (Lachhab et al., 2001). Ce problème peut être pallié par une forte aération et/ou une forte agitation, d'où une augmentation du coût de production.

En somme, l'utilisation de deux inoculations à des pourcentages faibles et des périodes différentes au cours de la fermentation pourrait entraîner une bonne amélioration de la croissance des cellules et des spores tout en réduisant les coûts de production de Bt. D'une part, les boues sont un substrat très riche en éléments nutritifs et d'autre part, le bacille Bt n'a plus une grande exigence nutritionnelle, particulièrement en oxygène, lorsque le processus de sporulation est déclenché. Il faut également noter que la sporulation permet la libération de substances intracellulaires. Obayashi et Gaudy (1973) ont classé les substances libérées par la lyse bactérienne suivant leur provenance en trois groupes :

- Celles qui proviennent du cytoplasme et qui contiennent surtout des enzymes solubles, des acides nucléiques et des produits de stockage d'énergie comme le glycogène et certaines protéines;
- Celles qui proviennent des membranes des cellules;
- Celles qui proviennent des exsudats qui tapissent normalement les parois extérieures des cellules.

Le premier groupe est constitué de substances facilement biodégradables et qui seront remétabolisées rapidement. Les deux autres groupes sont riches en polysaccharides et sont considérés comme non biodégradables selon certains auteurs comme Symons et MacKinney ou Washington et Symons, cités par Roques (1979). Toutefois, Obayashi et al. (1973) ont obtenu la dégradation des polysaccharides d'origine microbienne par des populations mixtes provenant de boues activées.

D'après l'étude du cycle biologique de *Bt*, on constate qu'après la sporulation, il y a libération de la spore et du cristal protéinique qui est un complexe toxique pour les insectes cibles. Donc, après cette période, l'inoculation du milieu avec un deuxième inoculant devrait croître le nombre de cellules et de spores sans avoir d'impact sur la quantité ou la qualité de spores et de cristaux déjà existant dans le milieu, les spores étant des produits très résistants. À signaler également qu'un fort taux d'oxygène est nécessaire à la sporulation, particulièrement pour la synthèse de précurseurs de la sporulation du bacille; une fois que ces derniers sont

produits, le processus de la sporulation peut être terminer avec un taux d'oxygène faible (Murrell, 1961).



# **CHAPITRE 2**Hypothèses et Objectifs

#### 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les boues des stations d'épuration, qui sont riches en éléments nutritifs et disponibles à moindre coût, sont efficaces dans la culture de *Bt* (Tirado-Montiel, 1997). Cependant, le faible potentiel entomotoxique obtenu lors de ces travaux nécessite d'approfondir les recherches afin d'obtenir des résultats concurrentiels avec le milieu synthétique. D'après la littérature la production de *Bt* dépend des conditions de fermentation, et du milieu de culture. Les hypothèses suivantes peuvent être donc posées:

#### Certaines souches de Bt isolées à partir des boues peuvent être plus efficaces.

L'efficacité du biopesticide dépend, entre autre, de la souche *Bt* employée, l'utilisation donc de souches sauvages isolées à partir des boues de stations d'épuration peut avoir un meilleur pouvoir insecticide.

> La nature du milieu de culture, le traitement de ce dernier et l'ajout de certains nutriments peuvent avoir un effet sur la production de *Bt*.

La composition et la nature du milieu de culture (différents types de boues, avec différentes concentrations de solides totaux), le <u>traitement et l'enrichissement</u> de ce dernier par des ajouts de certaines sources de nutriments peuvent influencer la croissance et la production du complexe spores-cristaux.

#### > L'inoculum est un facteur clé dans les procédés de fermentation :

Les méthodes de préparation de l'inoculum et de la préculture ainsi que le pourcentage d'inoculum utilisé lors de la fermentation de *Bt* peuvent améliorer sa croissance et son entomotoxicité et ainsi sa productivité dans les boues.

La double inoculation une méthode, développée au cours de ce travail et uttilisée pour la premiere fois dans un procédé de fermentation, est un moyen technique qui peut aider à améliorer le potentiel entomotoxique

La double inoculation, méthode développée au cours de ce travail, est un moyen technique qui peut entraîner une amélioration de la croissance et de la sporulation ainsi que de la production du  $\delta$ -endospore par Bt en fermentation dans les boues.

L'optimisation des différents paramètres pouvant influencer la croissance de Bt et la production de  $\delta$ -endotoxine dans les boues devrait donc permettre l'amélioration du potentiel entomotoxique du Bt tout en réduisant ses coûts de production et en participant à la gestion des boues. Pour y parvenir différents objectifs seront à atteindre.

#### Objectif général

Dans une perspective de développement durable dans le domaine de l'agro-foresterie et de l'environnement, cette étude a pour objectif :

A- de contribuer à développer un nouveau procédé de production de biopesticides plus efficace en améliorant d'une part, le potentiel entomotoxique grâce à la technique de la double inoculation, et d'autre part, en utilisant des boues des stations de traitements des eaux usées. Ces boues, qui causent un grand problème de gestion, ont des valeurs fertilisantes reconnues. Leur valorisation comme biopesticides sera donc d'une grande importance au plan agronomique et environnemental. De même leur utilisation comme substrat de culture va permettre de réduire le coût de production de *Bt*.

**B- d'optimiser les différents facteurs** limitant la production du biopesticide. Il permettra ainsi d'obtenir un produit concurrentiel par rapport aux biopesticides commerciaux, du point de vue efficacité et coût de production.

#### Objectif spécifique

L'objectif premier de cette étude est d'améliorer l'obtention du biopesticide Bt en utilisant différents types de boues des stations d'épuration des eaux usées et en variant divers paramètres influençant la croissance et la sporulation de Bt et son entomotoxicité. J'ai visé de vérifier les hypothèses spécifiques suivantes :

- 1- l'utilisation de souches sauvages isolées à partir des boues (exemple de *Bta*) peut entraîner une amélioration de l'entomotoxicité du biopesticide *Bt* en comparaison avec la souche de référence *Btk* (*Bt* variété kurstaki HD-1). Selon Dulmage et al., (1990) les besoins physiologiques de chaque sérotypes de *Bt* peuvent varier et ainsi influencer l'efficacité de *Bt*;
- 2- l'utilisation de boues de différentes origines, à savoir, municipales et industrielles, pourrait avoir un effet sur la croissance et l'entomotoxicité de *Bt*. Citons comme exemples, des boues riches en carbone azote (d'amidon et de levure), des boues contenant des solides d'origine minérale et organique (boues primaires), des boues secondaires qui sont riches en acides

nucléiques, en glycogène, en enzymes solubles et en certaines protéines libérées lors de la lyse bactérienne, des boues mixtes (un mélange de boues primaires et boues secondaires);

- 3- la concentration des solides totaux dans les boues influence non seulement la disponibilité des éléments nutritifs et les caractéristiques physico-chimiques des boues, mais, également le transfert de l'oxygène dans celles-ci. Cela peut donc avoir un impact sur la croissance et la production de  $\delta$ -endotoxine de Bt;
- **4- l'hydrolyse des boues** par des enzymes, des acides ou des bases fortes permet de transformer la matière organique en un produit facilement assimilable par les micro-organismes. Ce qui peut faciliter la croissance de *Bt* et améliorer le potentiel entomotoxique de cette dernière;
- 5- l'ajout d'extrait de levure pourrait avoir un effet sur la croissance et la production de la  $\delta$  endotoxine de Bt;
- 6- l'utilisation du même milieu de culture pour la préparation de la préculture de *Bt* et pour la production finale de ce bacille, peut réduire le temps de latence et ainsi, améliorer la croissance de *Bt*. Ainsi, il est pertinent de comparer l'effet du type de substrat utilisé pour la préparation de l'inoculum, à savoir, les boues vs TSB;

7-une forte concentration des cellules de *Bt* de l'inoculum peut entraîner rapidement un manque d'oxygène ou d'éléments nutritifs dans le milieu d'où une limitation de la croissance de *Bt*. Il importe donc de trouver l'optimum du pourcentage d'inoculum pour améliorer la production de *Bt* dans les boues;

- 8- l'étude de l'efficacité de la double inoculation aux cours de la fermentation de Bt dans les boues et l'optimisation des différents paramètres pouvant avoir un impact sur cette dernière, pourrait améliorer la croissance et la production de  $\delta$ -endotoxine de Bt. Il serait donc pertinent :
  - de comparer l'effet de la double inoculation dans les boues de la CUQ et dans le milieu synthétique;
  - d'étudier l'effet du pourcentage d'inoculum dans le cas de la double inoculation,
  - d'étudier l'effet de la concentration des soldes totaux sur l'efficacité de la double inoculation;
  - d'optimiser le temps au quel le deuxième inoculant doit être réaliser;

- de comparer l'effet du substrat de culture ( boues de la CUQ, d'amidon, le milieu synthétique) sur la méthode à double inoculation;
- d'évaluer l'effet de la double inoculation dans le cas des boues de la CUQ avec ou sans traitement enzymatique.
- 9- le suivi de certains paramètres de fermentation comme le pH, l'oxygène, le  $CO_2$ , C, l'activité protéolytique, ainsi que le suivi de l'évolution du potentiel entomotoxique en fonction du temps de fermentation de Bt peuvent aider à mieux comprendre le processus bio-chimiques de Bt et conduirait donc à améliorer la production du biopesticides Bt;
- 10- enfin, l'application des résultats dans des fermenteurs de 15L où le pH, la température, l'agitation et l'aération sont contrôlés par ordinateur, pourrait améliorer la croissance, la sporulation et le potentiel entomotoxique de *Bt*.

# CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

Deux souches de *B. thuringiensis*, *Bt* variété kurstaki HD-1 provenant de la collection de H.T. Dulmage et *Bta* une souche sauvage isolée à l'INRS-ETE, ont été testées. *Bt* variété kurstaki HD-1 a été utilisée comme souche de référence pour toutes les expériences. Cette variété est la plus utilisée dans l'industrie en raison de son potentiel entomotoxique contre une grande variété de Lépidoptères.

La majorité des procédés utilisés dans le traitement des eaux usées municipales produisent des boues provenant du procédé de séparation liquide-solide (décantation, flottation, etc.) ou résultant d'une réaction chimique (coagulation), biochimique ou encore biologique. Avant leur utilisation, les boues peuvent subir des traitements visant la réduction de la fraction organique ou de la teneur en matières volatiles. Toutes ces étapes font que la nature et la contenance des boues peuvent être différentes d'un procédé à l'autre et d'une station à l'autre. Il serait donc important d'utiliser différents types de boues pour la production de Bt afin d'améliorer la croissance et la production de la δ-endotoxine.

Différents types de boues d'origine industrielle ou municipale ont été utilisés afin d'améliorer la production de *Bt*. Il faut signaler que les boues choisies sont des boues qui font déjà l'objet d'épandage agricole et qui respectent les normes environnementales du Québec. Les caractéristiques des boues des usines de traitement varient en fonction de leur origine et du traitement qu'elles ont subi (par exemple : digestion aérobie des boues, digestion anaérobie des boues, stabilisation des boues, etc.). Il faut noter que leur contenu en carbone et en azote dépend du type de traitement.

Les boues primaires sont des boues d'épuration, produites dans les décanteurs primaires et sont généralement plus chargées en solides en suspensions d'origine minérale que les boues secondaires (Roques, 1979). Les boues secondaires produites dans le bassin d'aération et dans le clarificateur secondaires sont constituées d'un conglomérat de micro-organismes, de débris de cellules microbiennes lysées, de particules plus au moins facilement biodégradables, d'absorbants et de colloïdes organiques piégés dans le floc bactérien (Roques, 1979). Les boues mixtes sont un mélange des boues primaires et secondaires. Les boues récupérées suite au procédé de séparation

solide-liquide par flottation dans une usine de production d'amidon et de levure et riches en azote, carbone, minéraux, vitamines et autres éléments nécessaires à la croissance de *Bt*.

#### 3.1 Méthodologie générale

#### 3.1.1 Échantillonnage des boues

Six types de boues seront utilisés, à savoir : des boues mixtes et secondaires provenant de la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ); des boues primaires et secondaires de la station de traitement des eaux usées de la base militaire de Valcartier et des boues recueillies après flottation pour la séparation de la partie solide et de la partie liquide dans une usine de production d'amidon et de levure.

Les échantillons sont prélevés dans des contenants de polypropylène et sont stérilisés dans un autoclave à une température de 121°C pendant 30 minutes et finalement conservés à 0°C jusqu'à leur emploi. Ils ont également fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique (voir annexes).

#### 3.1.2 Caractérisation des boues

Les paramètres pris en considération lors de la réalisation des caractéristiques physicochimiques (Annexe I) sont les solides totaux (ST) et volatils (SV), les matières en suspension (MES) et volatiles (MESV). Ces paramètres sont déterminés au laboratoire selon les méthodes préconisées par APHA (1989).

Les nitrates, l'ammoniac, le phosphore total et les concentrations des métaux (Al, Cd, Cr, Fe, Mg, Mn, Pb, Zn, etc.) sont obtenues après analyse au spectrophotomètre à émission de plasma 'Inductively Coupled Plasma (ICP)' suivant les méthodes approuvées par APHA, AWWA ET WPCE (1989). Les boues sont digérées complètement à l'aide de l'acide avant leur analyse selon le protocole utilisé par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989). Le carbone total et l'azote total sont déterminés à l'aide d'un analyseur d'azote—carbone-soufre (nitrogen-carbon-sulfur analyser ou NCS) selon la méthode d'analyse du carbone total dans les sédiments accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1986).

Le pH a été évalué à l'aide d'un potentiomètre 'Fisher Accumet' au début et à la fin de chaque fermentation en erlenemeyer. Dans le cas des bioréacteurs le suivi du pH et de l'oxygène dissout était réalisé à l'aide de sondes placées à l'intérieur du fermenteur.

#### 3.1.3 Détermination des solides totaux (ST)

Au cours de la fermentation des boues secondaires de la CUQ, des échantillons d'un volume de 40 ml ont été pris chaque 3 heures afin de déterminer la concentration des solides totaux. Les échantillons ainsi prélevés sont placés dans des creusets pré-pesés et sont séchés à une température de 105°C pendant 24 heurs. Ils sont ensuite incubés pendant 1 heure dans un four à 550 °C après avoir été pesés. Le poids des échantillons de boues est déterminé également dans ce dernier cas. La concentration des solides totaux (C<sub>ST</sub>) et des solides volatiles (C<sub>SV</sub>) sont déterminées comme suit :

$$C_{ST}(g/I) = ((P_{105}-p_0)/V)*1000$$
  $C_{SV}(g/I) = ((P_{105}-p_{550})/V)*1000$ 

V : volume de 40 ml de boues ; C : concentration en g/l ;  $P_{105}$  : poids en g du creuset et du contenu après séchage à 105 °C ;  $P_{550}$  : poids en g du creuset et du contenu après séchage à 550 °C ;  $P_0$  : poids en g du creuset.

#### 3.1.4 Prétraitement hydrolytique des boues

Les boues d'épuration contiennent une partie de la matière organique sous forme de grandes macromolécules qui est difficilement biodégradable par les bactéries. Il est important d'évaluer si un prétraitement des boues peut améliorer la croissance de Bt dans ces dernières. Dans cette étude trois modes de traitement des boues ont été appliqués afin de transformer la matière organique contenue dans les boues de la CUQ en un produit facilement assimilable par les bactéries : le traitement acide à l'aide de l'acide sulfurique et le traitement alcalin à l'aide de NaOH.

<u>Dans le traitement acide</u>, les boues sont acidifiées à pH 2 à l'aide de l'acide sulfurique 1N et sont ensuite autoclavées à 121°C pendant 1 heure, après refroidissement le pH des boues est ajusté à 7 par une solution de NaOH 2N. Les échantillons sont ensuite stérilisés à une température de 121°C pendant 15 minutes.

<u>Le traitement alcalin</u>, le pH des boues est ajusté à 12 à l'aide d'une solution 2N, NaOH, puis entreposés pendant 24 heures à la température ambiante. Le pH des boues est ensuite ajusté à 7 à l'aide de l'acide sulfurique 1N. Les boues sont ensuite stérilisées à 121°C pendant 30 minutes.

<u>Le traitement enzymatique</u> des boues est utilisé comme pré-hydrolyse afin de permettre la digestion des glucides, des sucres fermentescibles et d'autres protéines contenues dans les boues et ainsi faciliter l'assimilation des éléments nutritifs par *Bt*. Le concentré enzymatique employé est le KamiZym-D dont la composition est illustrée dans le Tableau 8.44 (voir annexes). À cette

fin, une capsule de Kamizym-D est ajoutée dans un erlenmeyer contenant 100 ml de boues stériles qui est incubé pendant 12 heures à une température de 37 °C et sous une agitation de 250 rpm.

#### 3.1.5 Milieu synthétique

Le milieu synthétique de soya (Tirado-Montiel, 1997) a été utilisé. Sa composition contient par litre : farine de soya (15g), dextrose (5g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.02g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.3g), FeSO<sub>4</sub> (0.02g), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.02g) et CaCO<sub>3</sub> (1.0g). Ce milieu contenant tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et à la sporulation de *Bt* sert comme milieu de référence afin de pouvoir comparer son rendement avec celui des cultures réalisées sur les boues résiduaires des stations de traitements des eaux usées.

#### 3.1.6 Culture de Bt

#### 3.1.6.1 Préculture

Selon les expériences, la préculture est préparée en une ou deux phases :

#### A-Inoculum est préparé en une seule phase :

Des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de bouillon de TSB (3% de TSB, 0.03% d'extrait de levure sont ajoutés à 100 ml d'eau de dilution) sont inoculés avec une anse de culture de Bt (Bta ou Btk) qui est prélevée d'une gélose nutritive (Difco.) incubée à 31°C pendant 8 heures. Les erlenmeyers sont ensuite incubés pendant 10 h à 30°C sous une agitation de 250 rpm. Avec cette dernière culture ainsi préparée, j'ai inoculé des erlenmeyers contenant 100 ml de milieu de production final de Bt qui est dans ce cas les boues de différentes origines selon les expériences [Gélose  $\rightarrow$  TSB  $\rightarrow$  Boues (milieu de production final)].

#### B-Inoculum préparé en deux phases :

Dans un premier temps l'inoculât est préparé dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de Bouillon TSB, préalablement repiqué avec une colonie bactérienne (Bt) cultivée sur une gélose nutritive (Difco) qui a été incubée à 31°C pendant 8 heures. Les erlenmeyers sont ensuite incubés pendant 10 h à 30°C sous une agitation de 250 rpm. Avec cette dernière culture ainsi préparée, j'ai inoculé des erlenmeyers contenant 100 ml de boues qui sont à leur tour incubés dans les mêmes conditions mentionnées si haut. Au bout de 10 h d'incubation, l'inoculant ainsi préparé va servir pour l'inoculation finale du milieu de production final de Bt (Boue) qui est préalablement stérile [Gélose  $\rightarrow$ TSB  $\rightarrow$ Boues  $\rightarrow$  Boues (milieu de production final)].

#### 3.1.6.2 Culture

Pour la culture proprement dite, des erlenmeyers de 500 ml contenant  $1/5^{\text{ème}}$  de leur volume, à savoir, 100 ml de milieu synthétique ou de boues, sont inoculés avec une préculture à raison de 1% ou 2% (selon les expériences). Les erlenmeyers ainsi préparés sont incubés sous une température de  $31^{\circ}$ C et une agitation continue de 250 rpm (Environmental Incubator Shaker), un échantillon par erlenmeyer incubé est prélevé à raison de chaque trois heures pour la détermination de la croissance des cellules et des spores. À la fin de l'expérience, l'échantillon final est conservé à  $-20^{\circ}$ C pour la détermination du potentiel entomotoxique des différentes suspensions de Bt. Pour les dernières expériences de cette étude, le test de toxicité a été réalisé directement à la fin de la fermentation sans conservation. L'expérience s'est avérée plus efficace.

#### 3.1.7 Protocole expérimental pour dénombrer les cellules et les spores

#### 3.1.7.1 Préparation des boites de Pétri

Dans 2 l d'eau distillée, j'ai mis 60 g de TSB et 30 g d'Agar, puis j'ai stérilisé à une température de 121°C pendant 20 minutes. La solution est ensuite coulée dans des boites de Pétri sous des conditions stériles, pour éviter toute contamination.

#### 3.1.7.2 Préparation des dilutions pour inoculer les boîtes de Pétri

Les dilutions décimales sont faites dans une solution saline (0.85% de chlorure de sodium), pour cela 4.5 ml de la solution NaCl est introduit dans des tubes stérilisés, auquel j'ai ajouté 0.5ml de l'échantillon à tester. Les dilutions 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>... sont ensuite préparées tout en augmentant pour chaque échantillon en fonctions de la croissance cellulaires. Ces dernières vont servir pour l'étalement de 100 μl des dilutions sur les boîtes de Pétri contenant de la gélose TSA (tryptic soya agar). Des dilutions en eau physiologique sont réalisées pour chaque ml d'échantillon. Le dénombrement cellulaire se fait après 16 h d'incubation à 32°C des boîtes de Pétri déjà inoculées. Pour la détermination des spores, les dilutions sont incubées dans un bainmarie à 80°C pendant 10 minutes avant d'inoculer les boîtes de Pétri. Ces boites de Pétri sont ensuite incubées pendant 24 h à 32°C. Enfin le compte des cellules et des spores est réalisé; seul les Pétri contenant entre 30 et 300 colonies sont considérées, les résultats sont exprimés en UFC/ml; l'erreur a été évaluée dans ce cas à 5.4%.

Pour chacune des expériences réalisées en erlenmeyers ou en fermenteurs, le taux de croissance spécifique (μ) est calculé avec le temps de génération (tg) qui correspond au temps nécessaire pour que le nombre de cellules (N) double (2N). Le temps de génération est obtenu à l'aide de la pente (P) de la phase de croissance exponentielle.

P=
$$(\log Nt_1 - \log Nt_2)/(t_1 - t_2) = \mu$$
  
Ln 2N-ln N =  $\mu$  x t<sub>g</sub>  
 $\mu = 0.693 / t_g$ 

#### 3.1.8 Détermination de l'entomotoxicité par des bioessais

À la fin de chaque fermentation, le potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux est déterminé à l'aide des bioessais comparativement à l'activité de la préparation commerciale Foray 48B (Lab. Abbott, Chigago) dont le potentiel est de 12600 UI/µl.

#### 3.1.8.1 Insecte cible et élevage

Les insectes utilisés pour la détermination de l'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par la bactérie *Bt* (*Bta* et *Bt-HD1*) étaient des larves L3 et L4 de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) (*Choristoreuna fumiferana*) (Lepidoptera: Tortricidae). Les larves de deuxième âge de TBE provenant du Ministère des Ressources Naturelles du Canada (Saulte, Ste. Marie, Ont., Canada) sont gardées à une température de 0°C jusqu'à leur élevage.

#### 3.1.8.2 Préparation de la diète

Dans cette partie, la technique d'incorporation du complexe spores-cristaux dans la diète dont la composition est décrite dans le Tableau 8.45 (voir annexes), a été mise à contribution. Elle permet une bonne homogénéisation du complexe cristaux-spores dans la diète. C'est une méthode reconnue pour la réalisation des bioessais (Beegle, 1990).

La technique d'incorporation du complexe spores-cristaux consiste à préparer six dilutions décimales successives des différents échantillons de boues contenant le complexe spores-cristaux produit par fermentation de *Bt*. Un volume de 1 ml de la première dilution est incorporé dans un erlenmeyer de 125 ml contenant 10 ml de diète liquide et 10 ml d'une solution d'Agar 3% w/v (à 55°C). Le tout est bien mélangé et 1 ml est prélevé et déposé dans chacun des 20 tubes. La même opération est réalisée pour les autres dilutions et pour la préparation commerciale (Foray 48B) qui servira pour le calcul de l'entomotoxicité. Un témoin est également préparé au cours de

chaque test de toxicité; dans ce cas, l'eau de dilution est utilisée à la place de la suspension bactérienne. Le mélange est placé dans 40 tubes. La réalisation du témoin a pour objectif de contrôler la qualité du test de toxicité. La mortalité dans le cas du témoin ne doit pas dépasser 10%.

#### 3.2 Méthodologie spécifique

## 3.2.1 Effet de la variété de *Bt* sur la croissance, la sporulation et la production de l'endotoxine

## 3.2.1.1 Comparaison de la croissance de *Bta* (souche sauvage isolée à partir des boues) et de *Btk* (souche de référence)

L'utilisation de souches sauvages isolées à partir des boues peut entraîner une amélioration de la croissance et du potentiel entomotoxique de *Bt*. C'est pourquoi la croissance et la sporulation de la souche *Bta* (souche isolée à partir des boues) ont été comparées avec la souche de référence *Btk*. Le travail expérimental a été réalisé en fermenteurs 15A et 15B. Les caractéristiques physico-chimiques des boues utilisées sont présentées en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 12/01/98).

Pour cela 10 l de boues mixtes de la CUQ (la concentration des ST est de 40 g/l) a été placé dans chacun des bioréacteurs de 15 l (15A et 15B). La stérilisation des boues a été faite selon la méthode décrite au paragraphe 3.2.12. Une fois refroidi, chacun des deux fermenteurs est inoculé avec 1% d'une suspension de *Bta* et *Btk*. L'inoculum a été préparé en une seule phase selon la méthodologie décrite dans la Section 3.1.6. Les conditions de fermentation pour les deux souches sont maintenues constantes : une température de 31°C, une agitation de 250 rpm, un pH de 7 et un taux d'aération de 4 litres/minutes.

Le nombre de cellules et de spores viables est déterminé toutes les trois heures. À la fin de la fermentation, l'échantillon final est conservé à -20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

## 3.2.1.2 Matériel et méthode pour l'analyse comparative de la croissance des deux souches *Btk*, *Bta*

Quatre erlenmeyers de 500 ml, contenant en duplicata 100 ml de milieu synthétique ou de boues mixtes de la CUQ dont les caractéristiques physico-chimiques sont illustrées en Annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 12-01-98) (ST=40g/l), sont inoculés avec une préculture à raison

de 1% de *Bta* ou *Btk* et placés de façon aléatoire dans l'incubateur (Environmental Incubator Shaker) pendant 48 heures, sous une agitation continue de 250 rpm et une température de 31°C. À la fin de la fermentation des échantillons sont prélevés. Une partie de ces échantillons va servir pour la détermination du nombre des cellules et des spores tandis que le reste est conservé à – 20°C pour la réalisation du test du potentiel entomotoxique des différentes suspensions de *Bt*. Cette opération est répétée 9 fois, ce qui permet d'atteindre 36 répétitions. L'analyse de la variance ainsi que la détermination de l'écart type ont été faites à l'aide du logiciel SAS.

#### 3.2.1.3 Caractéristiques génétiques de la souche isolée à partir des boues Bta

Le but de cette expérience est d'évaluer si la souche *Bta* est toxique pour les Lépidoptères. C'est pourquoi le gène *cryIA(a)* caractéristique de cette famille est recherché. On amplifie donc par PCR la souche *Bta*, une souche *Bt kurstaki* de référence (possédant le gène *cryIA(a)* et la souche *Bt aizawai* de référence (possédant également le gène *cryIA(a)*). La séquence du gène *cryIA(a)* est maintenant connue et il est donc possible de l'amplifier par PCR.

Pour la caractérisation génétique de la souche *Bta*, il a fallu extraire l'ADN bactérien, le doser, et enfin amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) certains fragments de cet ADN. Cette amplification est obtenue à l'aide d'amorces spécifiques et des réactifs nécessaires (Taq ADN Polymérase, tétranucléotides) (Tableau 3.1). Enfin, une électrophorèse sur agarose permet d'identifier chaque fragment d'ADN amplifié; chacun correspondant à une séquence particulière d'un gène *Cry*. Les différentes variétés de *Bt* sont caractérisées par une combinaison particulière des gènes *Cry*, dont le résumé est illustré dans le Tableau 3.1. Chaque sous-espèce produit ainsi un cristal qui lui est propre, lui conférant des propriétés entomotoxiques spécifiques.

Tableau 3.1 : Répartition des gènes Cry dans quelques sous-variétés de Bt

Variété de <i>Bt</i>	Bt kurstaki	Bt israelensis	Bt tenebrionis	Bt aizawai
	Cry I A (a), (b), (c)	Cry IV A	Cry III A (a)	Cry I A (a), (b)
	Cry II A (a)	Cry IV B		Cry I C (a)
Gènes présents	Cry II B (b)	Cry IV C	·	Cry I D (a)
		Cry IV D		Cry II A (b)
		Cry XI A		Cry VII A (a)
<b>Toxiques pour</b>	Lépidoptères	Diptères	Coléoptères	Coléoptères,
		-		Lépidoptères

Extraction de l'ADN: La méthode de lyse par choc thermique dans des conditions stériles a été appliquée, pour lyser les cellules bactériennes et en extraire l'ADN. Une colonie de *Bt* de 8 heures ensemencées la veille est mise en suspension dans un eppendorf contenant 300 μL d'eau distillée stérile et agitée au vortex. Ensuite les tubes sont placés pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie d'eau bouillante, puis 5 min à 0°C dans la glace. L'opération est recommencée deux fois. Les tubes sont alors centrifugés 20 secondes à 10000 rpm, ce qui permet de précipiter les débris cellulaires et de récupérer dans des eppendorfs stériles de l'ADN qui restent dans le surnageant.

**Dosage de l'ADN**: Le dosage de l'ADN par méthode spectrophotométrique se fait sur 100 μL de chacun des surnageants récupérés ci-dessus à l'aide d'Ultrospec 3000 de Pharmacia-Biotech, qui donne directement la concentration d'ADN en μg/ml, à partir de l'absorbance en UV à 260 nm, ainsi qu'un indice du degré de pureté de l'échantillon. Le blanc est fait avec de l'eau distillée.

Polymérisation en chaîne de l'ADN: Une fois les échantillons dosés avec les différents réactifs décrits dans le Tableau 3.2 La PCR s'effectue en plusieurs cycles identiques comprenant trois phases: Dénaturation, Hybridation, Polymérisation (Voir Glossaire).

Tableau 3.2: Préparation des échantillons pour la PCR (concentration des réactifs)

Réactifs ajoutés	Concentrations
Tampon MgCl <sub>2</sub>	10 mM
dNTP	10 mM
Amorce CIJ-1	50 μΜ
Amorce CIJ-2	50 μM
Taq Polymérase	5 Ū/μL
ADN	1 μg /ml (préalablement dilué)

<sup>+</sup> Huile minérale stérile pour éviter l'évaporation des échantillons pendant les cycles d'amplification

#### 3.2.1.4 Électrophorèse et analyse de l'ADN amplifié :

Cette méthode a pour but de séparer les brins d'ADN formés lors du PCR. Elle repose sur le fait que l'ADN est chargé négativement à pH basique : cette dernière migre alors sur une plaque de gel, sous l'action d'un champ électrique, ce qui sépare les molécules en fonction de leur poids

<sup>5</sup> min à 94°C

<sup>40</sup> cycles de PCR : 1min à 94°C (dénaturation), 2min à 45°C (hybridation), 3min à 72°C (polymérisation)

moléculaire. Les fragments ayant migré sont repérés grâce au bromure d'éthydium (BEt), un agent intercalant qui se place entre les bases de la double hélice, et qui est fluorescent à 260 nm (UV).

Un gel d'agarose à 3% (Agar : 3 g / 100 ml) est réalisé dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA), contenant également 5g/ml de BEt. Le gel est coulé sur un plateau d'électrophorèse, puis placé dans une cuve remplie de tampon TAE 1X, contenant aussi 5g/ml de BEt. Des puits sont ménagés à l'aide d'un peigne. 20 µl de chaque échantillon amplifié par PCR sont largués avec précaution dans du gel ; procédé identique pour le marqueur dont les différents poids moléculaires sont connus. La migration se fait sous 85V et 0.04 A.

## 3.2.2 Effet du milieu de culture, des différents types de traitement et de l'enrichissement de ce dernier sur la croissance et la production du complexe spores-cristaux

Dans cette partie, différents types de substrats, à savoir, d'origines industrielles ou municipales : des boues primaires et des boues secondaires de Valcartier, des boues mixtes de la CUQ, des boues d'amidon et de levure, ont été utilisées, afin d'améliorer la production de *Bt*.

Il faut noter que, la composition physico-chimique des différents échantillons utilisés est décrite en annexe I. Les boues mixtes de la CUQ utilisées sont celles illustrées au Tableau 8.2 (échantillonnage du 14/07/99).

## 3.2.2.1 Comparaison de la croissance de *Btk* dans les boues de la CUQ et le milieu synthétique à base de farine de soya

La comparaison des deux milieux de culture, à savoir, les boues mixtes de la CUQ dont la concentration des solides totaux est de 46 g/l et le milieu synthétique (soya) (ST = 25 g/l) a été réalisée en fermenteurs 15A et 15B de capacités 15 l. Les caractéristiques physico-chimiques des boues sont illustrées en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 10/07/97). Pour cela, 10 l de boues et du milieu soya ont été introduits respectivement dans les bioréacteurs 15A et 15B. La stérilisation des deux milieux a été faite selon la méthode décrite à la section 3.2.9. Une fois stériles, les deux substrats sont inoculés de façon aseptique à l'aide de 1% d'une suspension de *Btk* préparée en une seule phase dans la TSB (voir méthodologie section 3.2.10). Les conditions suivantes ont été maintenues constantes durant la fermentation : une température de 31°C, une agitation de 250 rpm, un pH de 7 et un taux d'aération est maintenu à 4 litre/minute.

Le nombre de cellules et de spores viables a été déterminé toutes les trois heures. L'échantillon prélevé à la fin de la fermentation, est conservé à -20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

## 3.2.2.2 Influence de la concentration des solides totaux (ST) dans les boues de la CUQ sur la croissance de *Bt*

Une concentration élevée des solides totaux peut entraîner une mauvaise aération du milieu. Par contre un faible taux de ces solides totaux implique automatiquement une réduction de la concentration des éléments nutritifs dans les boues. Dans cette partie, ce paramètre très important doit être optimisé pour l'améliorer la croissance des cellules et des spores de *Bt*. Les concentrations suivantes ont été testées : 10 g/l, 20g/l, 26 g/l, 36g/l et 46 g/l.

Cinq erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de boue mixte de la CUQ diluée, de telle façon que les concentrations des solides totaux soient respectivement 10 g/l, 20g/l, 26 g/l, 36g/l et 46 g/l. Les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes, dont la concentration en solides totaux est de 46 g/l, sont présentées en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage de 12/01/98). Les cinq échantillons sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les erlenmeyers sont ensemencés avec 1 ml de l'inoculum préparé en une seule phase selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6. Ils sont ensuite incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Le nombre de cellules et de spores viables a été déterminé toutes les trois heures. L'échantillon final, après 52h de fermentation, est utilisé pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux (conservé à -20°C).

## 3.2.2.3 Comparaison de la croissance de *Bt* dans les boues primaires et secondaires de Valcartier

Dans cette expérience, trois erlenmeyers de 500 ml, contenant respectivement 100 ml de boues primaires de Valcartier, de boues secondaires de Valcartier (dont les caractéristiques sont décrites en annexe I, Tableau 8.4) et de milieu synthétique sont préparés en duplicata et sont stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont ensemencés avec 2 ml d'une suspension de *Bt* préparé en une seule phase selon la méthode décrite dans la section 3.1.6, puis incubés sous une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Les nombres de cellules et de spores viables sont déterminés toutes les trois heures. L'échantillon

final, après 60 h de fermentation, est conservé à une température de -20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

### 3.2.2.4 Étude de la croissance de *Bt* dans les boues mixtes de la CUQ, les boues d'amidon et de levure

Dans cette expérience trois erlenmeyers de 500 ml contenant respectivement en duplicata 100 ml de boues mixtes de la CUQ dont la concentration des solides totaux a été ajustée à 25g/l (caractéristiques illustrées en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 14.07.99)), de boues d'amidon et de levure (caractéristiques illustrées en annexe I, Tableau 8.5) sont stérilisées à 121°C pendant 30 minutes. Chaque type de boues est préparé en duplicata. Après refroidissement, les échantillons sont ensemencés avec 2 ml d'une suspension de *Bt* préparée en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6, puis incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Les nombres de cellules et de spores viables sont déterminés toutes les trois heures. L'échantillon final, après 60 h de fermentation, est conservé à – 20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

## 3.2.2.5 La performance de *Bt* (*Bta* et *Btk*) dans un mélange de boues mixtes de la CUQ, de boues d'amidon et de levure

L'ajout de boues d'amidon et/ou de levure aux boues de la CUQ peut leur apporter certains éléments nutritifs facilement biodégradables et donc améliorer la croissance et la production de la  $\delta$ -endotoxine de Bt.

Pour cela quatre erlenmeyers d'une capacité de 500ml sont préparés en duplicata et où j'ai introduit séparément:

- 100 ml d'un mélange de boues de la CUQ et de boue d'amidon dans une proportion de 50% (v/v);
- 100 ml d'un mélange de boues de la CUQ et de boue de levure dans une proportion de 50% (v/v);
- 100 ml d'un mélange de boues de la CUQ d'amidon et de levure dans une proportion de 1/3 chacun (v/v);
- 100 ml de boues mixtes de la CUQ.

Les erlenmeyers ainsi préparés sont stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Une fois refroidis, ils sont ensuite ensemencés avec 2 ml de l'inoculum préparé en deux phases selon la

méthodologie décrite dans la section 3.1.6, puis incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Les nombres de cellules et de spores viables sont déterminés toutes les trois heures. À la fin de la fermentation, des échantillons sont prélevés et sont utilisés pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

Il faut noter que les caractéristiques des boues de la CUQ sont illustrées en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 14.07.99) et celles des boues de levure et d'amidon sont illustrées en annexe I, Tableau 8.5.

#### 3.2.3 Étude de l'effet du traitement des boues sur la croissance de Bt

L'hydrolyse des boues rend les éléments nutritifs disponibles et facilement biodégradables par les bactéries, ce qui peut avoir un impact sur la croissance et l'entomotoxicité de *Bt*. Afin de tester cette hypothèse quatre erlenmeyers d'une capacité de 500 ml contenant:

- 100 ml de boues mixtes de la CUQ traitées avec de l'acide sulfurique;
- 100 ml de boues mixtes de la CUQ traitées avec une base NaOH;
- 100 ml de boues mixtes de la CUQ traitées avec l'enzyme KamiZym-D;
- 100 ml de ces mêmes boues sans traitement.

Les erlenmeyers sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont ensemencés avec 2 ml d'une suspension de Bt préparé en deux phases selon la méthode décrite dans la section 3.1.6. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Les nombres de cellules et de spores viables sont déterminés toutes les trois heures. À la fin de la fermentation des échantillons sont prélevés et sont utilisés pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

Il importe de noter que l'hydrolyse des boues est réalisée selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.4 et chaque traitement est fait en duplicata. Les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes de la CUQ, utilisées au cours de cette expérience, sont présentées en annexe I Tableau 8.1 (échantillonnage du 12/01/98).

#### 3.2.4 Influence de source additionnelle (extrait de levure) sur la croissance de Btk

Comme l'activité entomotoxique de *Bt* dépend de la production du complexe spores-cristaux, la production de ce complexe pourrait être améliorée en faisant varier les concentrations des

sources de carbone et d'azote dans le milieu. En effet, la production de certains métabolites microbiens peut être stimulée par la variation des conditions de culture (Sherrer et al.,1973).

L'addition d'une source d'azote, de minéraux et de vitamines, peut être d'une grande importance pour la croissance des cellules et des spores de *Bt* et pour la production de δ-endotoxine. Différentes concentrations d'extrait de levure ont donc été ajoutées dans les boues de la CUQ diluées (ST est de 25 g/l) dont la composition physico-chimique est décrites en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 22/04/99). Pour cette expérience, 1g/l et 2 g/l d'extrait de levure sont additionnés respectivement dans 2 erlenmeyers d'une capacité de 500 ml contenant chacun 100 ml de boues mixtes de la CUQ. Un troisième erlenmeyer est utilisé comme témoin c'est-à-dire contenant les boues mixtes de la CUQ sans extrait de levure. Chaque traitement a été fait en duplicata. Les six erlenmeyers sont stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Une fois refroidis, les échantillons sont ensemencés avec 2 ml d'une suspension de *Bt* préparé en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6, et incubés à une température de 31°C et avec une agitation de 250 rpm. Les nombres de cellules et de spores viables sont déterminés toutes les trois heures. À la fin de la fermentation, des échantillons sont prélevés et sont utilisés pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

#### 3.2.5 Influence de l'inoculum

#### 3.2.5.1 Effet de l'inoculum préparé dans les boues et dans TSB à partir de Bta

Deux types d'inoculum ont été préparés en utilisant les deux méthodes de préparation d'inoculum exposées dans la section 3.1.6 tout en respectant la nature du milieu de culture utilisé, à savoir les boues mixtes de la CUQ ou le TSB. Les caractéristiques physico-chimiques des boues utilisées sont décrites en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 03/09/98). Les comparaisons suivantes ont été faites :

Deux erlenmeyers de 500 ml de capacité contenant 100 ml de boues mixtes de la CUQ ont été stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont ensemencés avec 1 ml d'une suspension de *Bt* préparée selon les deux méthodes de préparation d'inoculum décrites dans la section 3.1.6. Les expériences sont réalisées en duplicata pour les deux types d'inoculum (préparé dans les boues ou dans le TSB). Les erlenmeyers sont ensuite incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Le nombre de cellules et de spores viables est déterminé chaque trois heures. Après 51 heures de fermentation, l'échantillon

final (4–5 ml) est conservé à –20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux obtenu.

## 3.2.5.2 Comparaison de différents pourcentages de l'inoculum dans le cas de la croissance de *Bta*

Ce travail tente également d'optimiser le volume de l'inoculum utilisé pour la production de *Bt*. Dans ce cas les concentrations suivantes 1%, 2%, 3%, 4%, 5% d'une suspension bactérienne de *Bt* ont été comparées.

Cinq erlenmeyers de 500 ml de capacité contenant 100 ml de boues mixtes de la CUQ ont été stérilisés à une température de 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont inoculés avec respectivement 1%, 2%, 3%, 4%, 5% v/v (volume/volume) d'une suspension de Bt, préparée en une seule phase selon la méthode décrite dans la section 3.1.6 et incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Le nombre de cellules et de spores viables a été déterminé chaque trois heures. L'échantillon final prélevé à la fin de la fermentation est conservé à -20°C pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe spores-cristaux.

Il importe de noter que les caractéristiques physico-chimiques des boues utilisées sont décrites en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 06/01/99).

#### 3.2.6 L'effet d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Bt

L'étude de l'inoculum a permis de constater qu'un pourcentage très élevé de l'inoculum ne permet pas d'obtenir une bonne productivité de *Bt*. Cela entraîne donc une faible entomotoxicité. Ce résultat a conduit au développement d'une nouvelle méthode d'inoculation. Cette méthode consiste à utiliser deux inoculations au cours de la même fermentation à des pourcentages plus faibles. Cette technique a fait l'objet d'une optimisation au cours de cette étude.

#### 3.2.6.1 Protocole de la deuxième inoculation

Pour une meilleure utilisation des éléments nutritifs dans les boues et pour palier au problème d'une mauvaise oxygénation du milieu causée par l'utilisation d'un nombre élevé de cellules dans l'inoculant au cours de la fermentation de *Bt* dans les boues, une nouvelle méthode d'inoculation a été développée dans ce travail. Cette dernière consiste à utiliser au cours de la même fermentation deux inoculations à des périodes différentes et à des pourcentages de 1% d'une suspension bactérienne préparée en deux phases selon la méthode décrite dans la section 3.1.6. La

première inoculation a été faite au temps 0 de la fermentation, alors que la deuxième a été réalisée après 24 heures de fermentation. Chaque fois après trois heures, des échantillons sont prélevés pour le dénombrement des cellules et des spores. À la fin de la fermentation, des échantillons sont prélevés et sont utilisés directement sans conservation pour la détermination du potentiel entomotoxique de *Bt*. Les différentes expériences sont réalisées en duplicata et les moyennes ont été utilisées à des fins d'interprétation.

Un premier essai a été réalisé sur les boues mixtes de la CUQ et les boues d'amidon dont les résultats étaient très intéressants du point de vue concentration des cellules et des spores. Les caractéristiques physico-chimiques des boues de la CUQ sont illustrées en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 13.10.99) et celles des boues d'amidon sont décrites en annexe I, Tableau 8.5. Suite à ce résultat, j'ai tenté, d'une part, de comprendre le mécanisme de la deuxième inoculation et d'autre part, d'étudier l'impact de certains paramètres, comme le temps de la réalisation de la deuxième inoculation, la concentration des solides totaux dans les boues, le pourcentage d'inoculum utilisé, au cours des travaux qui suivent.

#### 3.2.6.2 Étude de la deuxième inoculation dans le surnageant.

Après 24 h de fermentation de *Bt* dans les boues mixtes de la CUQ et dans le milieu soya, les deux milieux (soya et boues) sont récupérés de façon aseptique et centrifugés à une vitesse de 45000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Ils sont ensuite filtrés à 0.2 µm afin d'éliminer toutes les cellules bactériennes contenues dans les milieux de culture. Les surnageants sont ensuite inoculés par une suspension de *Bt* préparée en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6. Au cours de la fermentation de Bt, des échantillons sont prélevés toutes les trois heures pour la détermination du nombre de spores et de cellules.

Cette expérience permettrait de déterminer si le milieu de culture (surnageant des boues de la CUQ) est encore capable, après 24 heures de fermentation, de supporter la croissance d'un deuxième inoculant et de vérifier son efficacité finale.

Il faut noter que, la composition physico-chimique des boues mixtes de la CUQ utilisées au cours de cette expérience est illustrée en annexe I Tableau 8.2 (échantillonnées le 13/10/99).

### 3.2.6.3 L'effet de différent pourcentage d'inoculum dans le cas d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Bt

Quatre pourcentages d'une suspension bactérienne, préparés en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6, ont été utilisés : 1%, 1.5%, 2%, 3% d'une suspension de Bt. 100 ml des boues mixtes de la CUQ stériles, dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites en annexe I Tableau 8.1 (échantillonnage du 11-01-00), sont introduites dans quatre erlenmeyers de 500 ml de volume. Ces derniers sont alors inoculés séparément avec des pourcentages de 1%, 1.5%, 2%, et 3% (v/v) de Bt. Après 24 heures de fermentation les deux premiers erlenmeyers, c'est-à-dire ceux inoculés dans un premier temps avec un pourcentage de 1%, 1.5%, sont ré-inoculés avec le même pourcentage de Bt qu'initialement soit respectivement de 1% et 1.5%. Au cours de la fermentation, des échantillons sont prélevés chaque trois heures pour la détermination de la concentration des cellules et des spores. À la fin de la fermentation, des échantillons sont récupérés pour la détermination du potentiel entomotoxique.

Cette technique va permettre de déterminer le pourcentage d'inoculum optimum qu'il faut utiliser dans le cas de la deuxième inoculation et de comparer la croissance de *Bt* dans le cas d'une seule inoculation de 2% et 3% et celle de la technique de deux inoculations chacune de 1% et 1,5%.

## 3.2.6.4 L'effet de différentes concentrations de solides totaux dans le cas d'une deuxième inoculation

Dans cette partie trois concentrations de solides totaux dans les boues mixtes de la CUQ dont la composition est décrite en annexe I Tableau 8.1 (échantillonnage du 11-01-00), ont été utilisées 25 g/l, 35 g/l, 45 g/l. Pour cela, les volumes de boues suivants ont été introduits dans trois erlenmeyers de 500 ml de capacité:

- 100 ml de boues stériles dont la concentration en solides totaux est 25 g/l;
- 100 ml de boues stériles dont la concentration en solides totaux est 35 g/l;
- 100 ml de boues stériles dont la concentration en solides totaux est 45 g/l.

Cette opération a été refaite pour trois autres erlenmeyers. Les six erlenmeyers, ainsi préparés, sont alors inoculés séparément avec un pourcentage de 1% d'une suspension de *Btk* préparée en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6. Après 24 heures de fermentation les trois premiers erlenmeyers (dont la concentration des boues est respectivement

de 25 g/l, 35 g/l, 45 g/l) sont réinoculés avec 1% une suspension de *Btk* préparée dans les mêmes conditions que le premier inoculant afin de conserver les mêmes caractéristiques. Au cours de la fermentation, des échantillons sont pris à chaque 3 heures afin de déterminer le pourcentage de cellules et de spores. À la fin de la fermentation, des échantillons sont prélevés et sont utilisés directement, sans conservation, pour la détermination de la toxicité finale.

### 3.2.6.5 Étude de l'effet du temps de la deuxième inoculation sur la croissance de *Btk* et son entomotoxicité

Le temps de la réalisation de la deuxième inoculation peut avoir un impact sur la croissance et la sporulation du premier inoculant, de même que sur le temps de fermentation, l'optimisation de ce dernier est donc d'une grande utilité.

Pour cela quatre temps d'inoculation ont été choisis, à savoir, après 15h, 24h, 36h et 48h, le pourcentage d'inoculum utilisé est de 1% d'une suspension de *Btk*, préparée en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6. 100 ml de boues mixtes de la CUQ, dont la composition physico-chimique est décrite en annexe I Tableau 8.1 (échantillonnage du 11-01-00), ont été introduites dans cinq erlenmeyers de 500 ml de capacité. Au début (t=0) de la fermentation, le premier erlenmeyer a reçu une seule inoculation qui est de 2%, les quatre autres sont inoculés dans un premier temps à t=0 avec un pourcentage de 1% et ils ont fait l'objet d'une deuxième inoculation qui a été réalisée comme suit :

- Le 2<sup>ème</sup> erlenmeyer est réinoculé avec un pourcentage de 1% de *Bt* au temps t=15h;
- Le 3 ème erlenmeyer est réinoculé avec un pourcentage de 1% de Bt au temps de 24h après;
- Le 4<sup>ème</sup> erlenmeyer est réinoculé avec un pourcentage de 1% de *Bt* au temps 36h;
- Le 5<sup>ème</sup> erlenmeyer est réinoculé avec un pourcentage de 1% de *Bt* au temps 48h.

Le deuxième inoculant est préparé dans les mêmes conditions que le premier inoculant. A chaque trois heures des échantillons sont prélevés pour le dénombrement des cellules et des spores, à la fin de la fermentation, des échantillons sont récupérés et directement utilisés pour la détermination du potentiel entomotoxique de *Bt*.

## 3.2.6.6 Expérience réalisée en fermenteur pour le suivi de l'évolution de l'oxygène et du pH dans les boues de la CUQ

Le suivi de O<sub>2</sub> et du pH dans le milieu de culture a été réalisé dans des bioréacteurs de 15l de volume (15A et 15B). La température, aération, agitation et pH sont contrôlés par un système informatisé permettant ainsi l'optimisation des différents paramètres du procédé. Au cours des expériences conduites dans les bioréacteurs 15A et 15B, un volume de 10 L de boues (mixtes ou secondaires selon les expériences) de la CUQ est utilisé.

1- suivi de O<sub>2</sub>: la concentration de O<sub>2</sub> dans le milieu n'a pas fait l'objet d'un contrôle au cours de la fermentation, les autres paramètres de fonctionnement du procédé, à savoir, l'agitation (350 rpm), le pH (7), la température (31°C) et la mousse sont par contre maintenus constants.

2- suivi du pH: le pH est ajusté au début de la fermentation à 7 et n'a pas été contrôlé au cours de la fermentation, les autres paramètres, à savoir, l'agitation (350 rpm), le débit d'air (4 l/min), la température (31°C) et la mousse ont fait l'objet d'un contrôle au cours de la fermentation.

Des valeurs de O<sub>2</sub> et du pH sont prélevées chaque 3 h de façon automatique à l'aide d'une sonde à O<sub>2</sub> et à pH placés dans les boues à l'intérieur du fermenteur, ces dernières sont préalablement calibrées.

## 3.2.6.7 Étude de l'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la deuxième inoculation

La composition physico-chimique des boues mixtes de la CUQ utilisées au cours de cette expérience est décrite en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 11-01-00).

Quatre erlenmeyers de capacité 500 ml ont été préparés en duplicata : Dans le 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> erlenmeyers j'ai mis 100 ml de boues mixtes de la CUQ traitées avec Kamizym-D selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.4. Dans le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> j'ai mis des boues mixtes de la CUQ sans traitement.

Les erlenmeyers sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont ensemencés avec 1 ml d'une suspension de *Btk*, préparée en deux phases selon la méthodologie décrite dans la section 3.1.6. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm. Après 24 h de fermentation le 2ème et 4ème

erlenmeyers sont réinoculés avec 1 ml d'une suspension de *Btk* qui a été préparée dans les mêmes conditions que le premier inoculant afin de conserver les mêmes caractéristiques. Le nombre de cellules et de spores viables est déterminé toutes les trois heures. L'échantillon final après 51h de fermentation, est utilisé pour la détermination du potentiel entomotoxique du complexe sporescristaux.

## 3.2.6.8 Matériels et méthode pour l'analyse comparative de la croissance des deux types d'inoculation (1%+1% et 2%)

Cette étude a pour but la comparaison statistique de la croissance de Bt dans le cas d'une seule inoculation et dans le cas de deux inoculations. Pour cela quatre erlenmeyers de 500 ml de capacité ont été préparés en duplicata :

- 100 ml de milieu synthétique ont été introduit dans le 1 er et le 2 er erlenmeyer;
- 100 ml de boues mixtes de la CUQ, dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites en annexe1 (échantillonnage du 11-01-00), ont été introduites dans le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> erlenmeyers.

Le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> erlenmeyers sont inoculés avec une préculture à raison de 2% de Btk au temps t=0. Les deux autres, c'est-à-dire le 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup>, sont inoculés avec la même préculture à raison de 1% au temps t=0 et après 15 h de fermentation ils sont réinoculés avec 1% d'une suspension de Bt préparée dans les mêmes conditions que celle du premier inoculant.

Les quatre échantillons sont placés de façon aléatoire dans l'incubateur (Environmental Incubator Shaker) pendant 48 heures, sous une agitation continue de 250 rpm et une température de 31°C. À la fin de la fermentation des échantillons sont prélevés pour la détermination du nombre des cellules et des spores. Une partie de ces échantillons est conservée à –20°C pour la réalisation du test du potentiel entomotoxique des différentes suspensions de *Bt*. Cette expérience est répétée 9 fois ce qui permet d'atteindre 36 répétitions. L'analyse de variance ainsi que la détermination de l'écart type ont été réalisées à l'aide d'un programme informatisé réalisé sur le logiciel SAS.

## 3.2.7 Méthodologie de l'étude des protéases sur les boues dans le cas de la deuxième inoculation

Mesure de l'activité enzymatique : les enzymes sont des protéines de très hauts poids moléculaires et sont constitués de longues chaînes d'acides aminés (Pelczar et al., 1981). Les

enzymes agissent comme des catalyseurs de réactions chimiques. De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peut être représentée par l'équation suivante :

Enzyme (E)+Substrat (S) 
$$\leftrightarrow$$
 Complexe (ES)  $\leftrightarrow$  Produit (P) + Enzyme (E) (1) (Michaelis et al., 1913)

L'activité enzymatique est le nombre de molécules de substrats transformés en une minute par une molécule d'enzyme. Il suffit de mesurer donc la vitesse de réaction (1) exprimée par la quantité de substrats détruits ou par la quantité de produits formés en fonction du temps. Une des méthodes pour déterminer l'activité protéolytique est de quantifier la tyrosine libérée lors de l'hydrolyse de la caséine par les protéases. La mesure de la tyrosine ainsi libérée se fait par lecture de densité optique qui peut être convertie en concentration de tyrosine libérée dans le filtrat (Hashimoto et al., 1972; Fukumoto et al., 1974).

**Réaction enzymatique:** Les boues secondaires de la CUQ, dont les caractéristiques sont illustrées en annexe 1, et le milieu soya sont utilisés pour la culture de Bt, afin de tester et de comparer la production enzymatique de Bt.

Dans cette expérience, 1 ml de chaque échantillon (après fermentation de *Bt* dans les boues ou le milieu soya des échantillons sont prélevés pour la détermination de l'activité protéolytique) à tester a été utilisé. J'ai ajouté 5 ml de solution de caséine. Après une incubation du mélange caséine-protéase à 30°C durant 10 minutes, pour permettre aux protéases de digérer la caséine, 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) (36 ml d'une solution 50% (p/v) d'acide trichloracétique, 220 ml d'une solution 1M d'acétate de sodium, 330 ml d'une solution d'acide acétique dans un volume total de 1000 ml) sont additionnés afin d'arrêter la réaction. Le mélange est ensuite incubé à 30°C durant 30 minutes afin d'assurer la précipitation totale de la caséine non hydrolysée. Cette solution est alors filtrée avec du papier Whatman 934-AH, pour récupérer le filtrat contenant la tyrosine.

Un étalon est aussi réalisé en additionnant à 5 ml de la solution de caséine à 5 ml de la solution de TCA. Après une incubation à 30°C durant 10 minutes, 1 ml de la solution enzymatique est ajouté et on procède ensuite à une autre incubation à 30°C pendant 30 minutes. Le précipité de caséine non hydrolysée est éliminé par filtration sur du papier filtre Whatman 934-AH.

Mesure de l'activité enzymatique: Pour mesurer l'activité enzymatique la méthode directe, qui consiste en une mesure directe de l'absorbance lue à 275 nm, est mise en application. Les absorbances sont mesurées sur un spectrophotomètre UV visible DMS 200 de la compagnie Varian. Les densités optiques ainsi déterminées sont reportées en concentration de tyrosine libérée dans le filtrat. Il existe une autre méthode dite indirecte qui permet d'obtenir des résultats similaires d'après les travaux de Meunier (1999), J'ai opté pour la méthode directe pour la réalisation de ce travail. Les lectures d'activités enzymatiques sont toujours effectuées en duplicata pour chacun des échantillons.

Pour décrire les résultats obtenus, l'activité enzymatique est exprimée en U.I. dont la définition est donnée par la Commission sur les enzymes de l'Union Internationale des biochimistes : une unité d'enzyme hydrolyse la caséine pour produire la coloration équivalente à 1.0 μmoles (ou 181 μg) de tyrosine par minute à pH 8.2 et à 37°C.

Courbe d'étalonnage: La production de courbes d'étalonnages de tyrosine permet d'établir une relation directe entre la concentration en tyrosine et l'absorbance d'une solution donnée. Une solution de tyrosine comprise entre 0 et 181.0 mg de tyrosine (1.0 mM) est préparée. La tyrosine est diluée dans la 50% de tampon borate et 50% de la solution d'acide tricholoroacétique. Les absorbances (275 nm) sont ensuite mesurées et reportées sur un graphique. La courbe d'absorbance suit une tendance linéaire (Annexes).

#### 3.2.8 Matériels utilisés (Bioréacteurs 15L)

Les fermentations sont réalisées dans des erlenmeyers. Cependant, des travaux au début de cette étude ainsi qu'une application finale des résultats ont été réalisés en bioréacteurs de 15L (15A et 15B) (Figure 3.1). Les paramètres de fonctionnement du procédé, à savoir, la température, l'aération, l'agitation et le pH, sont contrôlés à l'aide du logiciel FIX version 5.5. Un système d'agitation contrôlé par un tachymètre permet une gamme importante de vitesse. L'aération est contrôlée par un débitmètre massique (Durkert). Le contrôle de la température se fait à l'aide d'une boucle de re-circulation d'eau chaude. Le pH est contrôlé, de façon automatique ou manuelle selon le besoin, par des pompes à l'aide de solutions de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) ou de base NaOH (2N). Le contrôle de la mousse s'effectue de manière automatiquement à l'aide d'une solution de Polyéthylène glycol 10% par pompes. Les valeurs de la concentration de l'oxygéné et du pH sont recueillies à raison de 6 secondes, par contre celles de CO<sub>2</sub> échantillonné

dans les gaz de sortie du fermenteur sont recueillies toutes les 15 minutes. Ce recueil de mesures est rendu possible grâce à des analyseurs numériques Rosemount Analytical (Rosemount® Analytical Inc.).

Il faut signaler qu'au début de chaque fermentation, la sonde d'oxygène est calibrée. Le 100% en oxygène dans le milieu a été ajusté au début à l'aide d'une forte aération, le 0 est ajusté à l'aide de l'azote.

Les boues utilisées pour la réalisation de ces travaux sont les boues mixtes de la CUQ. Cependant l'application finale a été réalisée avec des boues secondaires dont les caractéristiques sont décrites en annexe1, ce changement a été fait suite à des problèmes mécaniques apparus dans les fermenteurs au cours de nos travaux, et qui sont provoqués par la présence de concentrations élevées de solides (sables) dans les boues mixtes.

#### 3.2.9 Stérilisation des boues dans les bioréacteurs 15L

Au cours des expériences conduites dans les bioréacteurs 15A et 15B, un volume de 10 l de boues de la CUQ est utilisé. La stérilisation des boues se fait avec de la vapeur fournie par une chaudière à vapeur 48KW (Caloritech Inc.) à une température de 121°C pendant une durée de 30 minutes. Le temps d'ouverture de la vanne est de 1 seconde afin d'assurer la stérilisation de la tuyauterie et d'éviter toute possibilité de contamination du milieu. L'agitation est généralement maintenue constante à 250 rpm.

#### 3.2.10 Inoculation des boues et fermentation dans le bioréacteur 15L.

L'inoculum des boues est préparé 10 h à l'avance. Pour cela, 100 ml de boues stériles sont introduites dans un erlenmeyer de 500 ml et sont inoculées par la souche bactérienne *Bacillus thuringiensis* dans une proportion de 1% ou 2% selon les expériences et incubées dans un incubateur Environ-Shaker (Lab-line) à une température de 31°C et une agitation de 250 rpm durant 10h. Le produit fermenté final est utilisé pour inoculer aseptiquement les boues stériles dans le fermenteur.

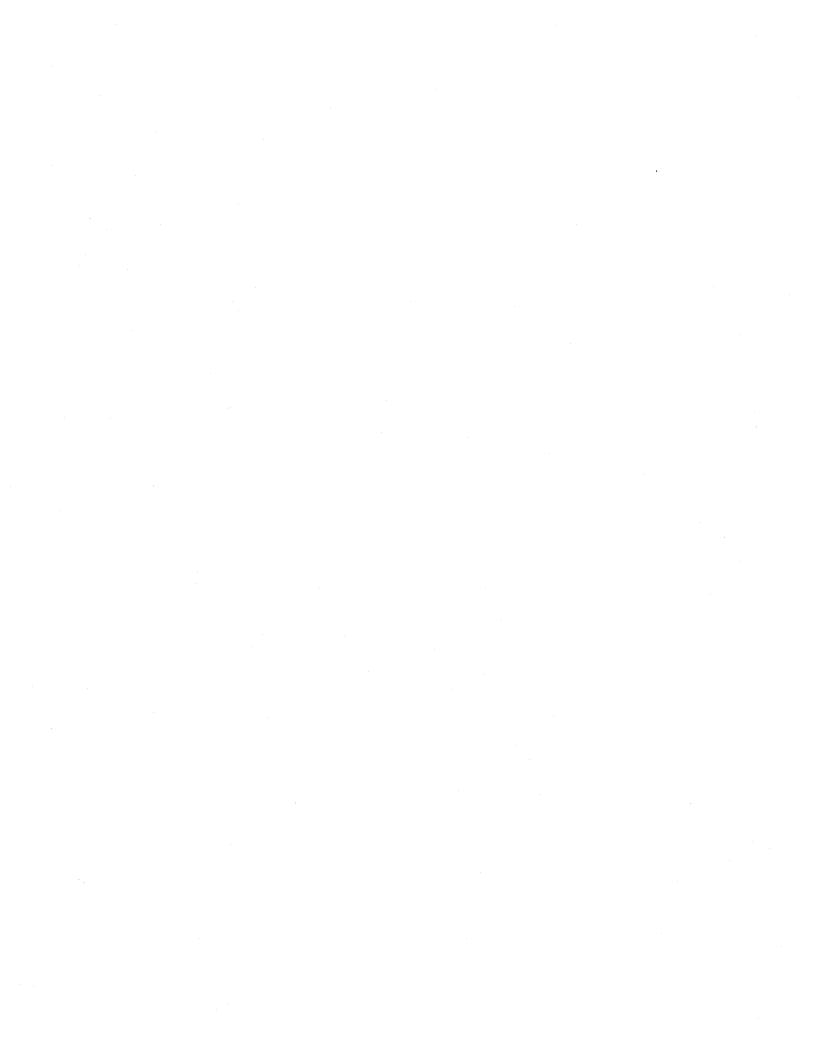
Après inoculation des boues dans le fermenteur, les conditions suivantes sont maintenues constantes: une température de 31°C, une agitation de 250 ou de 350 rpm selon les expériences, un pH de 7 et un taux d'aération de 4 litres/minutes.

Des échantillons sont récoltés toutes les trois heures pour l'évaluation du nombre de cellules et de spores et pour déterminer le potentiel entomotoxique.



Figure 3.1: Photo représentant le fermenteur 15L

# CHAPITRE 4 RÉSULTATS



### 4 RÉSULTATS

# 4.1 Effet de souches naturelles de Bt : comparaison de la croissance de deux souches Btk, Bta dans les boues mixtes de la CUQ en fermenteur

La culture de *Bta* (souche isolée des boues de stations de traitement des eaux usées à l'INRS-ETE) et de *Btk* (souche de référence), dans les boues mixtes de la CUQ, permet de constater que la souche *Bta* croît plus rapidement dans les boues. Le taux de croissance spécifique dans le cas de *Bta* est de 0.42 h<sup>-1</sup> alors qu'il est de 0.33 h<sup>-1</sup> dans le cas de *Btk*. La concentration des cellules et des spores a atteint respectivement 9.7x10<sup>8</sup> et 9.4x10<sup>8</sup> UFC/ml dans le cas de *Bta* et 4.8x10<sup>8</sup> et 4.6x10<sup>8</sup> UFC/ml dans le cas de la souche *Btk* (Figures 4.1 et 4.2). Il importe de noter que les boues utilisées durant toute l'expérience ont été les mêmes afin d'éviter l'effet des variations qualitatives sur la comparaison de *Bta* et *Btk*. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont décrites en Annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 12/01/98), la concentration des ST dans ces boues est de 40 g/l, le rapport C/N est évalué à 12.13. Le calcul du potentiel entomotoxique a permis de confirmer les résultats précédents. L'entomotoxicité finale dans le cas de la souche *Bta* (10670 UI/μl) est supérieure à celles de la souche *Btk* (9190 UI/μl).

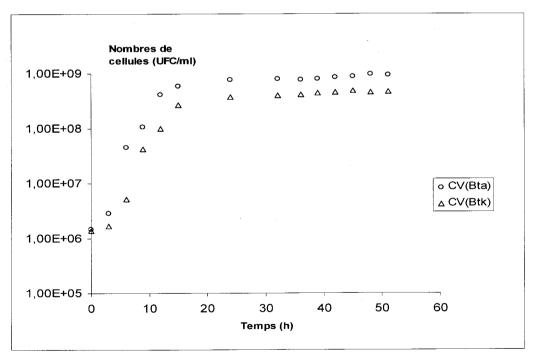


Figure 4.1: Comparaison de la croissance de Bta et Btk dans des boues mixtes de la CUQ : Nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe II, Tableau 8.7)

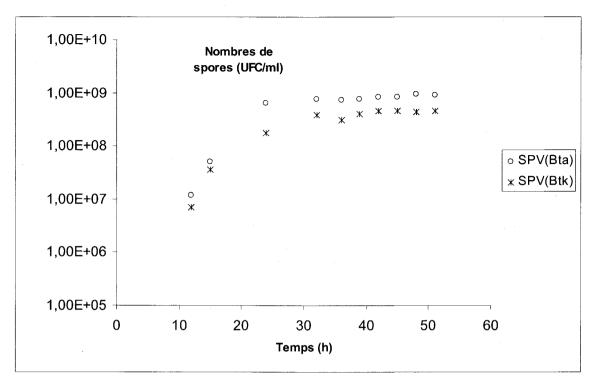


Figure 4.2: Comparaison de la croissance de *Bta* et *Btk* dans les boues mixtes de la CUQ : Nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe II, Tableau 8.7)

#### 4.1.1 Évolution de O2 et de CO2

Le suivi de  $O_2$  et  $CO_2$  a été réalisé grâce à la méthode décrite à la section 3.2.6.6. La Figure. 4.4 montre dans un premier lieu une diminution de la concentration de  $O_2$  au début de la fermentation, en même temps on assiste à une augmentation de la concentration de  $CO_2$  (Figure. 4.3).

Deuxièmement, il importe de remarquer que la production de CO<sub>2</sub> dans le cas de la souche *Bta* est plus importante par rapport à celle de la souche *Btk*, ceci malgré la phase de latence observée au début de la fermentation et qui pourrait être due à l'inoculum. De même, la consommation d'oxygène est supérieure dans le cas de *Bta* (Figure 4.4). La concentration de O<sub>2</sub> diminue au fur et à mesure que le nombre de cellules croît. Ces mesures permettent donc de confirmer les résultats de la comparaison des deux souches, indiquant un taux de croissance spécifique de *Bta* dans les boues plus élevé que celui de *Btk*. Afin de faire le suivi de O<sub>2</sub>, la concentration a été fixée initialement à 6.5 ppm

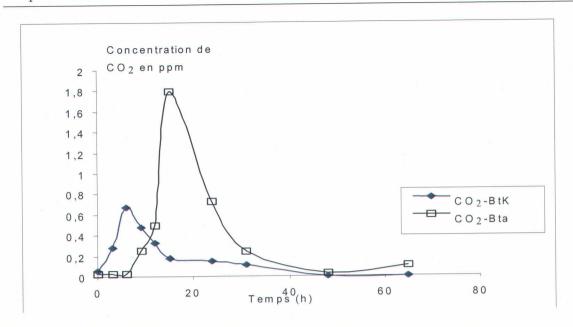
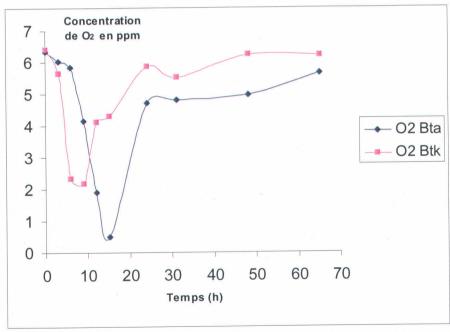


Figure 4.3: Évolution de la concentration de CO<sub>2</sub> contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : Cas des deux souches *Bta* et *Btk* (Voir annexe II, Tableau 8.8)

 $CO_2$ -Btk: Concentration de  $CO_2$  en ppm dans le cas de la souche Btk  $CO_2$ -Bta: Concentration de  $CO_2$  en ppm dans le cas de la souche Bta



Évolution de la concentration de l'oxygène contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15Aet 15B : cas des deux souches *Bta* et *Btk* (Voir annexe II, Tableau 8.8)

 $O_2$ - Btk: Concentration de  $O_2$  en ppm dans le cas de la souche Btk,  $O_2$ - Bta: Concentration de  $O_2$  en ppm dans le cas de la souche Bta

#### 4.1.2 Analyse comparative de la croissance et l'entomotoxicité de Bta et de Btk

L'analyse de la variance lors de la comparaison statistique du nombre de cellules et de l'entomotoxicité de *Bta* souche sauvage isolée des boues et de *Btk* souche de référence (résultats en Annexe XI, Tableau 8.42), dont les expériences ont été réalisées en erlenmeyers selon le protocole expérimental décrit dans la section 3.2.1.2, permet de constater une différence significative entre le nombre de cellules des deux souches (pr>F est de 0.0042). Ceci a été également observé dans le cas de l'entomotoxicité (pr>F est de 0.0094) (Tableaux 4.1 et 4.3). L'étude de la différence de l'effet du milieu (boue mixte de CUQ ou le milieu synthétique) sur la croissance des deux souches a été significative dans le cas de *Bta* (pr>F est de 0.0001), alors que cette différence est non significative dans le cas de la souche *Btk* (pr>F est de 0.1553) (Tableau 4.1). L'analyse de la variance dans le cas du potentiel entomotoxique a également confirmé ces résultats (pr>F, est de 0.2566, cas de la souche *Btk*) (Tableau 4.3). Il importe de noter que pour la validation du test, la normalité ainsi que la variabilité des résidus ont été vérifiées et respectées. Les tableaux 4.2 et 4.4 regroupent les moyennes des différents traitements.

Tableau 4.1: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de *Bta* et *Btk* dans les deux milieux soya et boue (cas du nombre de cellules).

	Valeur de F	Pr>ItI
Milieu (soya vs boue)	8.36	0.0080
Méthodes (Bta vs Btk)	10.01	0.0042
Boue/Bta-Btk	37.33	< 0.0001
Soya/Bta-Btk	6.78	0.0156
Bta/Boue-Soya	24.74	< 0.0001
Btk/Boue-soya*	2.15	0.1553*

<sup>\*</sup> la différence entre les deux milieux n'est pas significative dans le cas de Btk

<sup>•</sup> la déviation standard est de 0.54986 et la variance est de 0.30235

Tableau 4.2 : L'intervalle de confiance dans le cas du nombre de cellules calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions

Milieux	Souches	Moyennes	Moy-inférieures	Moy-supérieures
Boue		2.16 <sup>E</sup> +9	8.46 <sup>E</sup> +8	5.53 <sup>E</sup> +9
Soya		7.98 <sup>E</sup> +8	$3.11^{E} + 8$	$2.04^{E} + 9$
·	Bta	$2.58^{E} + 9$	$10.09^{E} + 8$	$6.60^{E} + 9$
	Btk	$6.69^{E} + 8$	$2.61^{E} + 8$	1.71 <sup>E</sup> +9
Boue	Bta	5.57 <sup>E</sup> +9	$2.06^{E} + 9$	$1.50^{E} + 10$
Boue	Btk	$8.40^{E} + 8$	$3.11^{E} + 8$	$2.26^{E} + 9$
Soya	Bta	1.19 <sup>E</sup> +9	$4.42^{E} + 8$	$3.22^{E} + 9$
Soya	Btk	$5.33^{E} + 8$	1.97 <sup>E</sup> +8	$1.43^{E} + 9$
Boue	Bta	5.57 <sup>E</sup> +9	$2.06^{E} + 9$	$1.50^{E} + 10$
Boue	Btk	$8.40^{E} + 8$	$3.11^{E} + 8$	$2.26^{E} + 9$
Soya	Bta	1.19 <sup>E</sup> +9	$4.42^{E} + 8$	$3.22^{E} + 9$
Soya	Btk	$5.33^{E} + 8$	$1.976^{E} + 8$	$1.43^{E} + 9$

Tableau 4.3: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de *Bta* et *Btk* dans les deux milieux soya et boue (cas de l'entomotoxicité)

	Valeur de F	Pr>ItI
Boue/Bta-Btk	86.15	<0.0001
Soya/Bta-Btk	7.97	0.0094
Bta/Boue-Soya	58.08	< 0.0001
Btk/Boue-soya*	1.35	0.2566*

<sup>\*</sup> la différence entre les deux milieux n'est pas significative dans le cas de Btk

Tableau 4.4 : L'intervalle de confiance dans le cas de l'entomotoxicité calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions

Milieux	Souches	Moyennes	Moy-inférieures	Moy-supérieures
Boue	-	10811	10511	11112
Soya		9667	9367	9968
·	Bta	11028	10727	11328
	Btk	9751	9150	9751
Boue	Bta	12021	11617	12424
Boue	Btk	9602	9199	10005
Soya	Bta	10035	9632	10438
Soya	Btk	9299	8896	9703
Boue	Bta	12021	11617	12424
Boue	Btk	9602	9199	10005
Soya	Bta	10035	9632	10438
Soya	Btk	9299	8896	9703

<sup>•</sup> Standard déviation est de 506.02 et la variance est de 0.30235

#### 4.1.3 Caractérisation génétique de Bta

Afin de caractériser génétiquement la souche *Bta*, dans le cadre de ce travail, le protocole expérimental décrit dans la section 3.2.1.3 a été suivi. Rappelons que la souche *Bta* est une souche sauvage isolée à l'INRS-ETE à partir des boues de l'usine de traitement des eaux de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ). L'analyse en microscopie optique en contraste de phase sur fond noir indique la présence de spores et de cristaux. Par ailleurs, l'utilisation de la méthode multiplex polymérase Chain Reaction a montré que la souche appartient à l'espèce *Bacillus thuringiensis*, par la présence des gènes Cry portant l'information de la toxine protéique (Figure 4.5).

Cette étude a également montré que *Bta* possède le pathotype *Cry IA* (a) -*Cry IC* (a), dont la bande correspond à une partie de la séquence du gène *cryIA*(a), vers 280 pb environs et *Cry IC*(a) vers 500 pb (Figures 4.5 et 4.6). On observe cette bande pour la souche *Bta*, permettant ainsi de constater la présence du gène *CryIA*(a) qui code l'endotoxine active contre les Lépidoptères et le gène *cryIC*(a) qui code l'endotoxine active contre les Coléoptères et les Lépidoptères; ce dernier est porté par la variété : *Bt. aizawai*. Cependant, pour une confirmation absolue des résultats obtenus, il faut faire des tests sérologiques. Parallèlement des bio-essais ont confirmé ces résultats. En effet, j'ai constaté au cours de ce travail que les suspensions de spores cristaux, des cultures de *Bta* et *Btk* dans les boues et dans le milieu synthétique, sont actives sur les larves de *Choristoneura fumiferana* ce qui montre bien que l'activité toxique de *Bt*, produite dans les boues, est bien maintenue et qu'elle peut être importante dans le cas de souches isolées à partir des boues.

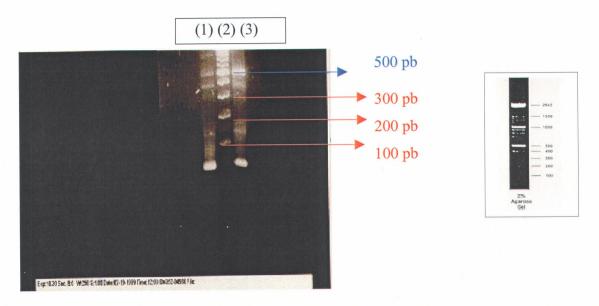


Figure 4.5: Electrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification d'ADN de la souche *Bta* et de la souche de références *Btk*: caractérisation globale recherche du gène CryIC spécifique contre les Lépidoptères

Puits n°1 : Bt var. kurstaki présentant une bande d'amplification d'un fragment d'ADN de 280 pb.

Puits n°2: marqueurs d'ADN avec des bandes d'amplification de 100 à 1200 pb.

Puits n°3: Bta isolée à partir des boues présentant une bande d'amplification d'un fragment d'ADN de 490 pb.

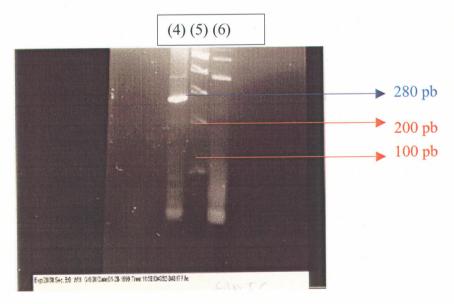


Figure 4.6: Electrophorèse sur gel d'agarose de produits d'amplification d'ADN de la souche *Bta* et de la souche de références *Btk*: caractérisation spécifique recherche du gène CryIA.

Puits n°4: Bta isolée à partir des boues présentant une bande d'amplification d'un fragment d'ADN de 280 pb.

Puits n°5: marqueurs d'ADN avec des bandes d'amplification de 100 à 1200 pb.

Puits n°6: souche de référence Bt var. kurstaki

# 4.2 Effet du milieu de culture, des différents type de traitement et d'ajout de nutriment sur la croissance et l'entomotoxicité

## 4.2.1 Étude préliminaire : Comparaison de la croissance de *Btk* dans les boues mixtes de la CUQ et le milieu synthétique à base de farine de soya

Au début de ce travail et sans optimisation, la croissance de *Btk* dans deux substrats a été comparée : dans le milieu synthétique (la concentration des solides totaux (ST) est de 25 g/l) et dans les boues mixtes de la station d'épuration de la communauté urbaine de Québec (CUQ), dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites en Annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 10/07/97). La concentration des ST dans ces boues était de 46 g/l. Le rapport C/N était de 9.5. Le travail expérimental a été effectué dans les fermenteurs 15A et 15B. Les conditions de fermentation sont : la température a été maintenue à 31°C, l'agitation à 250 rpm, le débit de l'aération à 2 litres/minute, le pourcentage d'inoculation choisi a été de 1%. Les résultats ont permis d'obtenir un nombre de cellules et de spores dans le cas des boues de 6.4x10<sup>8</sup> et 5.8x10<sup>8</sup>·UFC/ml. Alors qu'il est de 1.7x10<sup>9</sup> et 1.5x10<sup>9</sup> UFC/ml dans le cas du milieu soya (Figure 4.7), ceci avec un taux de croissance spécifique de 0.28 h<sup>-1</sup> dans les boues et de 0.30 h<sup>-1</sup> dans le soya. Les boues n'affectent donc pas la croissance et la sporulation de *Bt*.

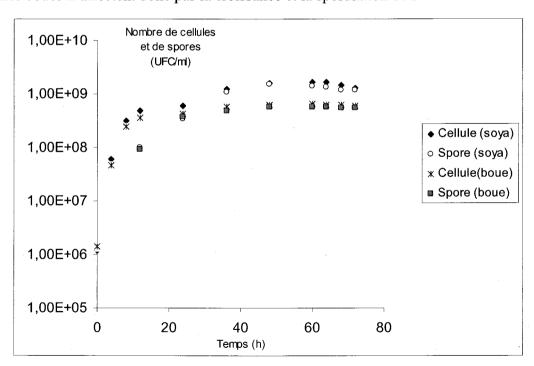


Figure 4.7: Comparaison de la croissance de *Btk* dans le milieu synthétique (soya) et dans les boues de la CUQ: Nombre de cellules et de spores en fonction du temps (Voir annexe II Tableau 8.6)

L'entomotoxicité est plus élevée dans le cas du milieu soya (11450 UI/ $\mu$ I), en comparaison avec celle des cultures dans les boues de la CUQ (9140 UI/ $\mu$ I). Notons que le pourcentage de sporulation dans ce dernier cas est de 85% alors qu'il était de 94% lors de l'utilisation du milieu soya comme substrat de culture de Bt. Une optimisation des paramètres pouvant influencer l'entomotoxicité de Bt dans les boues s'est aussi avérée nécessaire afin d'améliorer la croissance de Bt dans les boues, ainsi que son potentiel entomotoxique.

## 4.2.2 Étude de l'effet de la concentration des solides totaux (ST) des boues mixtes de la CUQ sur la croissance de *Bta* et *Btk*

Cette étude réalisée en erlenmeyers selon la méthodologie décrite dans la section 3.2.2.2, a permis de constater qu'une concentration des ST trop élevée (ST=46 g/l) permet d'obtenir une faible prolifération de la bactérie *Bt* par rapport à des boues dont la concentration en ST est de 26 g/l (Tableau 4.5 et 4.6). J'ai également constaté qu'une faible concentration des solides totaux (ST=10 g/l) entraîne un faible nombre de cellules et de spores. Cependant, pour une concentration de 26 g/l de ST dans les boues, une bonne croissance des cellules et des spores a été constatée (Tableau 4.5, Figures 4.9 et 4.10). L'étude du potentiel entomotoxique a permis également de confirmer ces résultats. L'entomotoxicité a atteint 12970 UI/µl dans le cas des boues avec une concentration des ST de 26 g/l. Cette dernière est plus faible dans le cas des boues à forte concentration des ST. Ces résultats ont été également confirmés dans le cas de la souche *Bta* cultivée en erlenmeyers (Tableau 4.6).

Le suivi de l'évolution de la concentration de O<sub>2</sub> dans les boues (ST46 g/l) au cours de la fermentation de Bt en bioréacteurs 15A et 15B (Figure 4.8), a permis de monter des concentrations de O<sub>2</sub> dans le milieu de culture inférieures à 1 ppm. Alors qu'il est resté supérieur à 2.5 ppm dans le cas des boues avec une siccité de 26 g/l. Il faut noter que la concentration de O<sub>2</sub> dans les boues au début de la fermentation avant l'inoculation de Bt était de l'ordre de 5 ppm.

Il importe de rappeler que les mêmes boues ont été utilisées durant toute l'expérience visant l'optimisation des solides totaux. Elles ont une concentration des solides totaux de 46 g/l et un rapport C/N de 12.13. les caractéristiques physico-chimiques de ces derniers sont présentées en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 12/01/98).

Tableau 4.5: Croissance de *Btk* dans des boues contenants différentes concentrations de solides totaux : nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (1) (Voir annexe V, Tableau 8.17)

	Nombre de cellules initiales	Nombre de cellules	Nombre de spores	Taux de croissance spécifique	% de sporulation	Toxicité	Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml))	(UFC/ml)	(h-1)	%	IU/μl	(h)
46 g/l	$8.2 \times 10^6$	$5.4 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	0.1410	89	9743	52
36 g/l	$7.9 \times 10^6$	$9.6 \times 10^8$	$8.8 \times 10^{8}$	0.1496	92	9800	52
26 g/l	$8.1 \times 10^6$	5.0 x10 <sup>9</sup>	4.2x10 <sup>9</sup>	0.2399	96	12970	52
20 g/l	$8.3 \times 10^6$	$6.4 \times 10^8$	$6.0 \text{x} 10^8$	0.2452	94	11520	52
10 g/l	$8.0 \times 10^6$	$4.3 \times 10^8$	$3.9x10^8$	0.2452	91	8231	52

(1): Lachhab et al. (2001)

Tableau 4.6: Croissance de *Bta* dans des boues contenants différentes concentrations de solides totaux : nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (1) (Voir annexe V, Tableau 8.18)

	Nombre de cellules initiales	Nombre de cellules	Nombre de spores	Taux de croissance spécifique	% de sporulation	Toxicité	Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml))	(UFC/ml)	(h-1)	%	IU/μl	(h)
46 g/l	$7.3 \times 10^5$	$6.5 \times 10^8$	$5.8 \times 10^8$	0.1246	89	10000	52
36 g/l	$6.9 \times 10^5$	1.62 x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	0.1666	94	10200	52
26 g/l	$7.1 \times 10^5$	$7.7x10^9$	$7.5 \text{x} 10^9$	0.3150	97	13100	52
20 g/l	$6.6 \times 10^5$	8.5 x10 <sup>8</sup>	$8.1 \times 10^8$	0.2485	95	12000	52
10 g/l	$7.0 \text{ x} 10^5$	$6.2 \times 10^8$	5.8108	0.272	94	9500	52

(1): Lachhab et al. (2001)

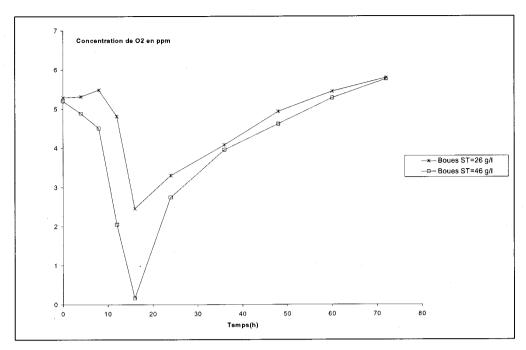


Figure 4.8: Comparaison de l'évolution de O<sub>2</sub> dans les boues de la CUQ dans le cas de deux concentrations de 26 g/l et 46 g/l (Voir annexe V, Tableau 8.19 et 8.20)

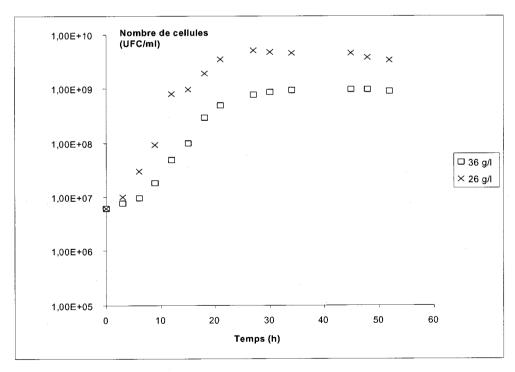


Figure 4.9: Comparaison de la croissance de *Btk* dans boues de la CUQ : nombre de cellules selon différentes concentrations de solides totaux (36 g/l, 26 g/l) en fonction du temps (Voir annexe V, Tableau 8.17)

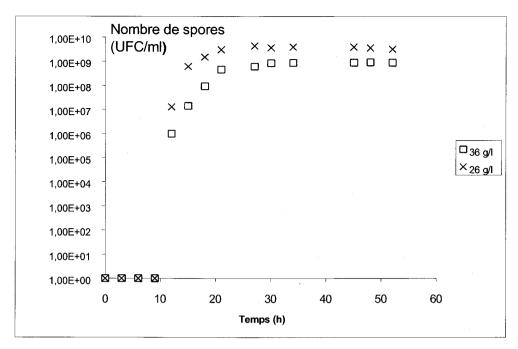


Figure 4.10: Comparaison de la croissance de *Btk* dans boues de la CUQ : nombre de spores selon différentes concentrations de solides totaux (36 g/l, 26 g/l) en fonction du temps (Voir annexe V, Tableau 8.17)

### 4.2.3 Étude de l'effet du type de boues sur la croissance de Bta et Btk

Des études réalisées par Tirado-Montiel (1997) ont montré l'effet de la variété de boues utilisées sur la croissance et la production de la  $\delta$ -endotoxine. Il importe de tester d'autres variétés de boues sur la croissance de Bt, ceci pourrait permettre d'une part d'améliorer le pouvoir entomopathogène du biopesticide Bt et d'autre part de réduire les coûts de sa production. Ainsi, des boues de plusieurs origines ont été utilisées comme substrat de culture de Bt. Des mélanges de deux types ou même trois a été également testés dans le but de varier leur contenu en carbone et en azote.

### 4.2.3.1 Boues primaires et secondaires de Valcartier

La comparaison du nombre de cellules et de spores de *Bt* cultivée dans deux types de substrats, à savoir, des boues primaires de Valcartier (ST est de 20.3 g/l et le rapport C/N est de 3.49) et les boues secondaires de Valcartier (ST est de 25.4 g/l et le rapport C/N est de 6.96) dont les caractéristiques physico-chimiques sont regroupées en Annexe I, Tableau 8.4, montre que les boues secondaires permettent une meilleure croissance de *Bta*. Les nombres de cellules et de

spores sont respectivement de  $6.7x10^7$  et  $5.3x10^7$  UFC/ml (Tableau 4.7), alors que les concentrations maximales des cellules et des spores de Bt cultivée dans les boues primaires, a atteint respectivement  $3.0x10^6$  et  $2.7x10^6$  UFC/ml (Figures 4.11 et 4.12). Ces résultats ont été également confirmés dans le cas de la souche Btk (Tableau 4.8). Le taux de croissance spécifique de Bta dans le cas des boues secondaires est plus élevé (0.26 h<sup>-1</sup>) que dans le cas des boues primaires (0.23 h<sup>-1</sup>). Les tests d'entomotoxicité ont également permis de constater une entomotoxicité plus élevée des suspensions de Bta obtenues dans le cas des boues secondaires de Valcartier (10513 UI/μl) en comparaison avec les boues primaires (7140 UI/μl).

Tableau 4.7: Croissance de *Bta* dans des boues primaires et secondaires de Valcartier: nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (Voir annexe III, Tableau 8.9)

	Nombre de cellules initiales (UFC/ml)	Nombre de cellules	Nombre de spores	Taux de croissance spécifique	Toxicité	Temps
	· · ·	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(h-1)	UI/μl	(h)
Boues primaires	$1.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	0.19	7875	60
<b>Boues secondaires</b>	$2.0x10^5$	$6.7x10^7$	$5.3x10^7$	0.23	11025	60

Tableau 4.8: Croissance de *Btk* dans des boues primaires et secondaires de Valcartier: Nombre de cellules et de spores et activité entomotoxique (Voir annexe III, Tableau 8.10)

	Nombre de cellules initiales (UFC/ml)	Nombre de cellules	Nombre de spores	Taux de croissance spécifique	Toxicité	Temps
		(UFC/ml)	(UFC/ml)	(h-1)	UI/μl	(h)
<b>Boues primaires</b>	$1.2x10^4$	$2.23 \times 10^6$	$2.12 \times 10^6$	0.16	6912	60
<b>Boues secondaires</b>	$1.0x10^4$	2.81x10 <sup>7</sup>	$2.72 \times 10^7$	0.22	10122	60

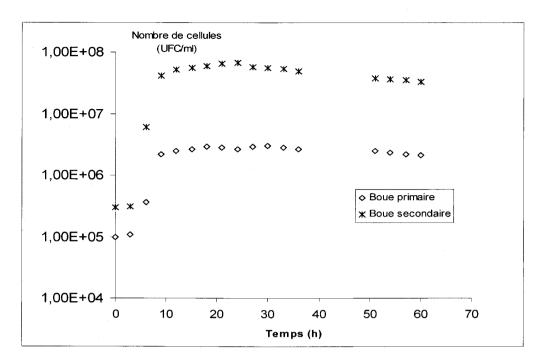


Figure 4.11: Comparaison de la croissance de *Bta* dans les boues primaires et secondaires de Valcartier: nombre de cellules obtenues en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.9)

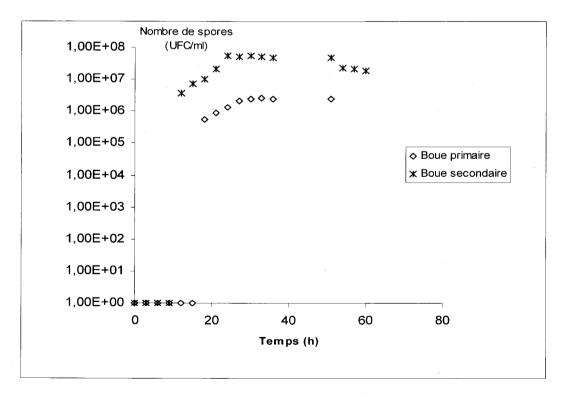


Figure 4.12: Comparaison de la croissance de *Bta* dans les boues primaire et secondaire de Valcartier: nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.9)

### 4.2.3.2 Boues de levure, boues d'amidon et boues de la CUQ

La comparaison du nombre de cellules et de spores de *Bta* obtenue avec l'utilisation de différents types de substrat (voir méthodologie dans la section 3.2.2.4) montre que les boues d'amidon (le rapport C/N est de 16.20 et ST est de 26.3 g/l et) dont les caractéristiques physicochimique sont regroupées en Annexe I, Tableau 8.5, permettent non seulement d'obtenir des concentrations des cellules et des spores plus élevées, mais également une meilleure entomotoxicité (Figures 4.13 et 4.14) (le nombre de cellules et de spores est de 2.2x10<sup>10</sup> UFC/ml, 2.1x10<sup>10</sup> UFC/ml dans le cas de la souches *Bta* et il respectivement de 1.3x10<sup>10</sup> UFC/ml, 1.1x10<sup>10</sup> UFC/ml dans le cas de la souches *Btk*) (Tableaux 4.9 et 4.10). La concentration des cellules et des spores de *Bt* cultivée dans les boues de la CUQ (voir caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 14/07/99)) était par contre de 4.9x10<sup>9</sup> UFC/ml, 4.5x10<sup>9</sup> UFC/ml. Par ailleurs, le nombre de cellules et de spores le plus faible est obtenu dans le cas de l'utilisation des levures (voir caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.5) comme substrat (le nombre de cellules est de 4.7x10<sup>8</sup> UFC/ml, le nombre de spores est de 4.3x10<sup>8</sup> UFC/ml).

La détermination du potentiel entomotoxique a permis de confirmer les résultats précédents. L'entomotoxicité finale dans le cas de la souche *Bta* cultivée dans les boues d'amidon (13540 UI/µl) est supérieure à celles des souches cultivées dans les boues de la CUQ (12560 UI/µl) (Tableau 4.9). Par ailleurs, c'est dans les boues de levure que les résultats sont les plus faibles, le potentiel entomotoxique étant de 8940 UI/µl dans le cas de *Bta* et il est de 7938 dans le cas de *Btk*.

La culture des deux souches *Bta* et *Btk* dans les différents types de substrats utilisés à savoir les boues mixtes de la CUQ, d'amidon, de levure et les boues primaires et secondaires de Valcartier permet également de constater que la souche *Bta* croît plus rapidement que la souche *Btk*.

Tableau 4.9 : Croissance de *Bta* dans le cas des mixtes de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules et de spores et entomotoxicité (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)

	Nombre de cellules (UFC/ml)	Nombre de spores (UFC/ml)	Temps de génération (h)	Toxicité (1) UI/μl	Temps (h)
Amidon	$2.2x10^{10}$	2.1x10 <sup>10</sup>	2.35	13540	52
CUQM	4.9x10 <sup>9</sup>	4.5x10 <sup>9</sup>	2.53	12560	52
Levure	$4.7x10^8$	$4.3 \times 10^8$	4.08	8940	52

Tableau 4.10 : Croissance de *Btk* dans le cas des boues mixtes de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules et de spores et entomotoxicité. (Voir annexe III, Tableau 8.11 b)

	Nombre de cellules			Toxicité	Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(h)	UI/μl	(h)
Amidon	$1.3x10^{10}$	$1.1 \times 10^{10}$	2.48	13115	52
CUQM	1.3x10 <sup>9</sup>	$1.1x10^9$	2.90	11355	52
Levure	$2.7x10^7$	$1.3x10^7$	4.90	7938	52

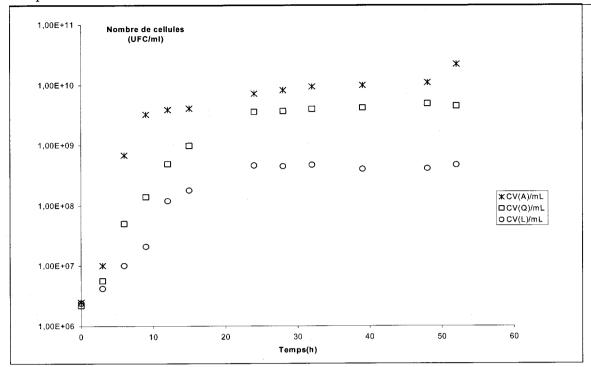


Figure 4.13 : Comparaison de la croissance de *Bta* dans différents types de boues à savoir de la CUQ, d'amidon et de levure : nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)

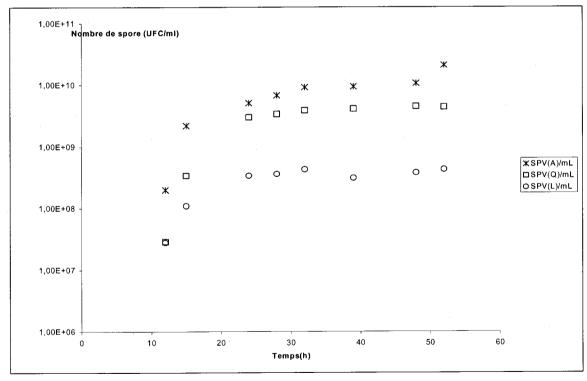


Figure 4.14: Comparaison de la croissance de *Bta* dans le cas des boues de la CUQ, d'amidon et des boues de levure: nombre de spores en fonction du temps (Voir annexe III, Tableau 8.11 a)

### A-Variation du pH

Le suivi de l'évolution du pH au cours de la fermentation de *Bt* dans trois types de substrat, à savoir, les boues de la CUQ, les boues d'amidon et le milieu soya (Voir annexe III, Tableau 8.12), a montré qu'au début de la fermentation, le pH descend jusqu'à des valeurs d'environ 4 dans le cas du milieu soya et atteint des valeurs de 6.26 dans le cas des boues de la CUQ et 6.04 dans le cas des boues d'amidon (Figure 4.15). Le pH remonte ensuite à environ 8. Le pH des boues de la CUQ ainsi que celui de l'amidon varient entre 6 et 8. En milieu synthétique, le pH varie entre 4 et 8.

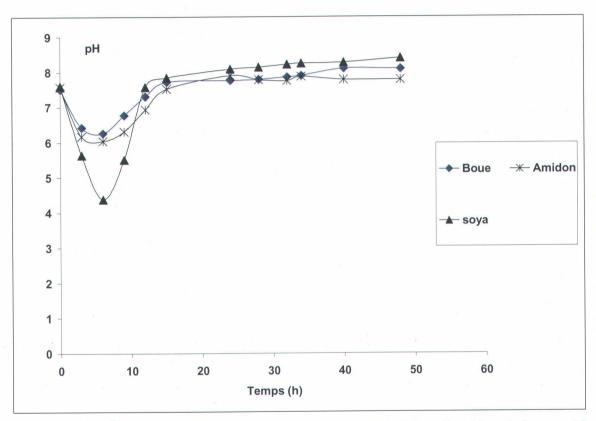


Figure 4.15: Évolution du pH lors de la fermentation de *Btk* dans l'amidon, la levure et les boues mixtes de la CUQ (Voir annexe III, Tableau 8.12)

## 4.2.3.3 Étude de la croissance des deux souches (*Btk* et *Bta*) dans le cas de mélange de différents types de boues : CUQML, CUQMA, CUQMAL, CUQM

Les différents résultats obtenus pour les souches *Btk* et *Bta* ont été reportés sur le Tableau 4.11. Ces résultats permettent de comparer le nombre de cellules et de spores finales pour les deux souches *Bta* et *Btk* dans le cas de mélanges de boues de la CUQ+boues de levure (CUQML), boues de la CUQ + boues d'amidon (CUQMA), boues de la CUQ + boues de levure + boues d'amidon (CUQMAL) et, finalement, dans le cas des boues de la CUQ (CUQM) selon la méthodologie décrite dans la section 3.2.2.5. Je note que les nombres de cellules et de spores de *Btk* les plus élevés (3.5x10<sup>10</sup> UFC/ml, 3.2x10<sup>10</sup> UFC/ml) sont obtenus lors de l'utilisation des boues de la CUQ avec un ajout d'amidon et de levure comme substrat de culture (Tableau 4.11) et lors de l'utilisation des boues mixtes de la CUQ avec ajout d'amidon. Le nombre de cellules a atteint dans ce dernier cas la valeur de 1.1x10<sup>10</sup> UFC/ml. Il faut cependant, noter que l'ajout des boues de levure aux boues de la CUQ permet une légère amélioration de la croissance de *Bt* alors que le potentiel entomotoxique reste relativement constant dans les deux cas.

L'évaluation du potentiel entomotoxique de *Bt* dans le cas des 4 milieux permet de tirer les mêmes conclusions. Le potentiel entomotoxique de *Btk* a atteint des valeurs de l'ordre de 13130 UI/µl dans les boues de la CUQ avec ajout d'amidon et de levure, alors qu'il est de 11250 UI/µl dans le cas de la culture de *Btk* dans les boues CUQ. Il importe de noter que l'ajout d'amidon seul aux boues de la CUQ permet une bonne amélioration de l'entomotoxicité, elle a atteint des valeurs de l'ordre de 13050 UI/µl (Tableau 4.11).

Tableau 4.11 : Étude de la croissance de *Bta* et *Btk* dans le cas d'une mixture de boue d'amidon, de boue de levure et de boues mixtes de la CUQ (CUQM) (Voir annexe III, Tableau 8.13 et 8.14)

	Nombre de cellules de <i>Bta</i> (UFC/ml)	Nombre de spores de <i>Bta</i> (UFC/ml)	Toxicité de <i>Bta</i> (UI/µl)	Nombre de cellules de Btk (UFC/ml)	Nombre de spores de <i>Btk</i> (UFC/ml)	Toxicité de <i>Btk</i> (UI/μl)	Temps de fermentation (h)
CUQM+ Amidon	7.2x10 <sup>10</sup>	5.2x10 <sup>10</sup>	13119	1.1x10 <sup>10</sup>	$1.0 \mathrm{x} 10^{10}$	13050	52
CUQM+ levure	$5.0 \text{x} 10^9$	4.5x10 <sup>9</sup>	12600	$9.0 \text{x} 10^8$	$8.8 \text{x} 10^8$	11112	52
CUQM+ Amidon+ levure	8.1x10 <sup>10</sup>	$7.7x10^{10}$	13370	3.5x10 <sup>10</sup>	$3.2x10^{10}$	13130	52
CUQM	2.6x10 <sup>9</sup>	1.9x10 <sup>9</sup>	12315	9.8x10 <sup>8</sup>	$8.7x10^8$	11250	52

## 4.2.3.4 Étude de l'effet de la croissance de *Btk* et *Bta* dans les boues mixtes de la CUQ avec différents types de traitement : acide, alcalin et avec des enzymes

Les Tableaux 4.12 et 4.13 résument les résultats du nombre de cellules, du nombre de spores et du potentiel entomotoxique des suspensions de *Bta* et de *Btk* dans le cas des boues mixtes de la CUQ avec ou sans traitement (les traitements utilisés au cours de travail sont : traitement acide, traitement alcalin, traitement enzymatique). Les boues utilisées sont les boues mixtes de la CUQ dont la concentration des ST est de 46 g/l et le rapport C/N est de 12.13 (caractéristiques physicochimiques en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 12.01.98)).

Les traitements ont été réalisés selon le protocole expérimental décrit dans la section 3.2.3. L'étude de la croissance des deux souches Bta et Btk dans le cas des boues avec traitement acide et alcalin permet de constater que les nombres de cellules et de spores sont plus élevées sur les boues ayant subi une hydrolyse acide à l'aide de  $H_2SO_4$  (nombre de cellules de  $Btk = 4.0 \times 10^9$  UFC/ml, nombre de spore de  $Btk = 3.5 \times 10^9$  UFC/ml). Il importe de noter que les résultats sur la croissance de Bt dans les boues traitées avec l'enzyme KamiZym-D sont similaires à ceux de la croissance de Bt dans les boues traitées avec l'acide  $H_2SO_4$ . Le nombre des cellules et des spores a atteint des valeurs de  $8.8 \times 10^9$  UFC/ml et  $7.3 \times 10^9$  UFC/ml dans le cas de Btk (Tableau 4.12). Cependant, le potentiel entomotoxique est relativement plus élevé dans le cas du traitement enzymatique des boues (12340 UI/ $\mu$ I), alors qu'il est de 11630 UI/ $\mu$ I dans le cas du traitement acide des boues. Le traitement alcalin permet d'atteindre une concentration des cellules et des spores de Btk relativement plus faible avec des valeurs de  $5.0 \times 10^8$  UFC/ml et  $4.8 \times 10^8$  UFC/ml. Ces résultats ont été également vérifier dans le cas de Bta (Tableau 4.12).

L'analyse des temps de génération montre que la croissance est relativement plus lente dans le cas des boues de la CUQ sans traitement, il est de 3.20 h dans le cas de *Btk*. Par ailleurs, il est plus faible pour chacune des souches produites dans les boues ayant subi des traitements (Tableau 4.13).

Tableau 4.12: Comparaison de la croissance de *Bta* dans des boues avec et sans traitement acide, alcali, et enzymatique (Voir annexe IV, Tableau 8.15)

	Nombre de cellules	Nombre de spores	Temps de Génération	Toxicité	Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	<b>(h)</b>	UI/μl	<b>(h)</b>
Boue de la CUQ avec	$7.4 \times 10^9$	6.9x10 <sup>9</sup>	2.40	11850	52
traitement acide					
Boue de la CUQ avec	$9.7x10^{8}$	$7.8 \times 10^{8}$	2.57	11230	52
traitement alcalin					
Boue de la CUQ avec	$9.8x10^{9}$	$9.1 \times 10^9$	2.19	12530	52
hydrolyse enzymatique					
Boue de la CUQ	$8.7 \times 10^8$	$7.7x10^{8}$	3.10	10400	52

Tableau 4.13 : Comparaison de la croissance de *Btk* dans des boues avec ou sans traitement acide (Voir annexe IV, Tableau 8.16)

	Nombre de Nombre de cellules spores		Temps de Génération	Toxicité	Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	( <b>h</b> )	UI/μl	(h)
Boue de la CUQ avec traitement acide	$4.0 \text{x} 10^9$	3.5x10 <sup>9</sup>	2.50	11630	52
Boue de la CUQ avec traitement alcalin	$5.0 \times 10^8$	4.8x10 <sup>8</sup>	3.13	10340	52
Boue de la CUQ avec hydrolyse enzymatique	8.8x10 <sup>9</sup>	$7.3x10^9$	2.48	12340	52
Boue de la CUQ	2.8x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	3.20	10120	52

# 4.2.4 Influence d'ajout de source additionnelle d'extrait de levure (EL) sur la croissance de *B. thuringiensis*

Les boues utilisées sont les boues mixtes de la CUQ dont la concentration des ST est de 37 g/l et le rapport C/N est de 9.32 et qui ont été diluées pour obtenir une siccité de 25 g/l (caractéristiques physico-chimiques en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage fait le 22/04/99)). L'addition d'extrait de levure (EL) en suivant le protocole expérimental décrit dans la section (3.2.4) a permis d'améliorer la croissance des cellules et des spores de *Bt*. Le nombre de cellules cultivées dans des boues, avec ajout d'EL, a atteint des valeurs de 8.8x10<sup>8</sup> UFC/ml dans le cas

d'ajout de 2 g/l et de  $4.9 \times 10^9$  UFC/ml dans le cas d'ajout de 4 g/l, alors qu'il n'a atteint que  $7.5 \times 10^8$  UFC/ml sans ajout de levure.

Une augmentation du potentiel entomotoxique a été également constatée dans le cas d'ajout de 4 g/l d'EL dans les boues. On a atteint des valeurs de l'ordre de 12210 UI/µl (Tableau 4.14). Ceci correspond à une amélioration du potentiel entomotoxique de l'ordre de 8.5%. Cependant, une faible amélioration a été constatée dans le cas d'ajout de 2 g/l d'EL (11740 UI/µl).

Tableau 4.14: Effet de l'ajout d'extrait de levure sur la croissance des cellules et des spores et du potentiel entomotoxique de *Bt* (Voir annexe VI, Tableau 8.21)

	Nombre de cellules initiales	Nombre de cellules	Nombre de spores	Temps de Génération	Toxicité
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	<b>(h)</b>	UI/μl
Boue de la CUQM avec 0	5.6 10 <sup>5</sup>	$7.5 \ 10^8$	6.4 10 <sup>8</sup>	3.35	11250
g de EL					
Boue de la CUQ avec 2 g	5.1 10 <sup>5</sup>	$8.8 \; 10^8$	$7.6 \ 10^8$	2.92	11740
de EL					
Boue de la CUQ avec 4	5.2 10 <sup>5</sup>	4.9 10 <sup>9</sup>	4.5 10 <sup>9</sup>	2.44	12210
g de EL					

### 4.2.5 Étude de la reproductivité des boues

Dans cette partie quatre échantillonnages, de boues mixtes de la CUQ dont la composition physico-chimique est illustrée en annexes, ont été réalisés au cours de l'année 1999 à différentes périodes. Les concentrations en ST sont de 44 g/ pour les boues échantillonnées le 06/01/99, de 37 g/l pour les boues échantillonnées le 22/04/99, de 40 g/l pour les boues échantillonnées le 14/07/99, de 38 g/l pour les boues échantillonnées le 13/10/99 (Voir annexe I, Tableau 8.2). Ces échantillons ont été stérilisés à 121°C pendant 30 minutes et conservé à 0°C jusqu'utilisation.

La culture de *Bt* dans différents échantillons de boues et l'analyse des résultats obtenus (Tableau 4.15) permet de constater une légère différence entre les différentes concentrations des cellules et des spores : elle est de l'ordre de 6.3x10<sup>9</sup> UFC/ml dans le cas des boues récoltées le 06/01/1999, ces dernières avaient un rapport C/N de 11.72 et une concentration en ST de 44 g/l, alors qu'elle est de 9.7x 10<sup>8</sup> UFC/ml pour les échantillons récoltés le 22/04/1999 et où le rapport C/N était de 9.32. et la concentration de ST était de 37 g/l. Il n'y a cependant pas de différence

importante entre les différents potentiels entomotoxiques, la variabilité de ce dernier reste inférieur à 3%.

Tableau 4.15: Étude de l'effet du temps d'échantillonnage des boues de la station d'épuration des eaux usées sur la croissance et l'entomotoxicité de *Bta* (Voir annexe VII, Tableau 8.22)

Date	Nombre de cellules initiales	Nombre de cellules	Nombre de spores	% de sporulation	Temps de Génération	Toxicité
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(%)	(h)	UI/μl
06-01-1999	$1.0 \mathrm{x} \ 10^{5}$	$6.3 \times 10^9$	6.1x10 <sup>9</sup>	95	2.27	12091
22-04-1999	$1.5 \ 10^5$	$9.7x10^{8}$	$8.8 x 10^8$	94	2.37	11747
14-07-1999	$1.5 \ 10^5$	$9.9 \ 10^8$	$9.4\ 10^8$	95	2.38	11931
13-10-1999	$2.7 \ 10^5$	5.7 10 <sup>9</sup>	4.9 10 <sup>9</sup>	96	2.20	12045

### 4.2.6 Étude de l'évolution de l'entomotoxicité en fonction du temps

Cette étude permet de montrer que la courbe de l'entomotoxicité suit une tendance polynomiale avec un coefficient de détermination R<sup>2</sup> de 0.88 (Figure 4.16). Le potentiel entomotoxique au début de la fermentation de *Bt* dans les boues de la CUQ est faible (4250 UI/µl). Au bout de 40 h de fermentation (Figure 4.16), l'entomotoxicité atteint son maximum de 12360 UI/µl. Elle diminue ensuite légèrement vers la fin de la fermentation (après 48h de fermentation) pour atteindre 11580 UI/µl. Il faut rappeler qu'au début de ce travail le temps de fermentation était de 72h.

Il faut noter que le substrat utilisé au cours de cette expérience sont des boues mixtes de la CUQ dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites dans le Tableau 8.2 Annexe I (échantillonnage du 22-04-99). Les concentrations des cellules et des spores atteintes dans ces boues sont respectivement de 5.5x 10<sup>9</sup> UFC/ml et de 5.1x 10<sup>9</sup> UFC/ml (Tableau 8.27 b, Voir annexe IX).

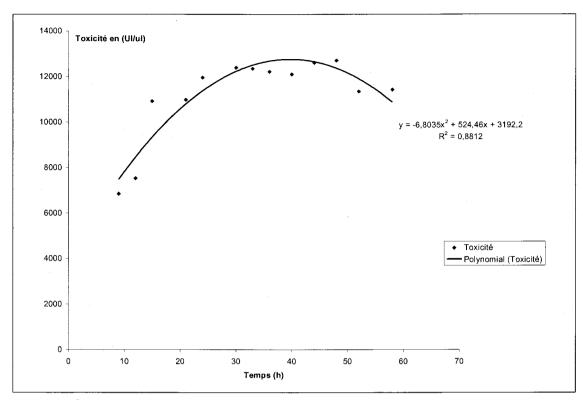


Figure 4.16: Évolution du potentiel entomotoxique des suspensions de *Btk* obtenues en fonction du temps (Voir annexe IX, Tableau 8.27 a)

### 4.3 Étude de l'effet de l'inoculum sur la production de B. thuringiensis

### 4.3.1 Effet du milieu de préparation de l'inoculum sur la production de Bta et Btk

La culture de *Bt* dans cette étude a été réalisée dans les boues mixtes de la CUQ, dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites en Annexe I Tableau 8.1 (échantillonnage du 03/09/98), la concentration des ST dans ces boues est de 43 g/l, le rapport C/N est évalué à 11.69. Il faut signaler que les mêmes boues ont été utilisées durant toute l'expérience.

La préparation de la préculture selon la méthodologie décrite dans la section 3.2.5.1 dans le même substrat que celui utilisé pour la culture finale de Bt (boues de la CUQ) a permis d'améliorer de manière significative le nombre de cellules et de spores obtenu (Figures 4.17 et 4.18). En effet, le taux de croissance spécifique de *Btk* dans le cas d'une préculture dans les boues (0.32 h<sup>-1</sup>) est plus élevé que dans le cas de la TSB (0.26 h<sup>-1</sup>) (Tableau 4.16 et 4.17). Il importe également de noter que, la sporulation dans le cas de l'utilisation des boues mixtes de la CUQ comme substrat de la préculture commence plutôt que dans le cas de la TSB (Figure 4.18). La réduction du temps de latence permet ainsi de réduire le temps de la sporulation. Les mêmes constatations ont été faites dans le cas de *Bta* (Tableau 4.16).

L'utilisation du TSB comme milieu de préculture montre une phase de latence plus longue (Figure 4.17) lors du transfert du *Bt* entre les deux milieux de culture à savoir TSB/Boues de la CUQ, ce qui réduit l'efficacité et la performance de l'inoculum. Il est important de signaler la reproductibilité des résultats dans le cas de l'utilisation du même inoculum dans des conditions similaires. Les expériences décrites ci-dessus ont fait l'objet de plusieurs répétitions et les résultats obtenus furent similaires.

Tableau 4.16 : Résultats de la croissance de *Btk* avec deux milieux de préculture à savoir les boues et la TSB(1). (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)

	Nombre de cellules initiales (UFC/ml)	Nombre de cellules (UFC/ml)	Nombre de spores	Taux de croissance spécifique	Toxicité	Temps
	()	,	(UFC/ml)	(h-1)	UI/μl	(h)
Préculture boue	$3.2x10^5$	$1.74 \times 10^9$	$1.70 \text{x} 10^9$	0.32	12300	51
Préculture TSB	$3.5x10^5$	$9.1 \times 10^{8}$	$7.9x10^8$	0.26	10500	51

<sup>(1)</sup> Lachhab et al. (2001)

Tableau 4.17 : Résultats de la croissance de *Bta* avec deux milieux de préculture à savoir les boues et la TSB. (Voir annexe VIII, Tableau 8.24)

	Nombre de cellules (UFC/ml)	Nombre de cellules (UFC/ml)	Nombre de spores (UFC/ml)	Temps de génération (h)	Toxicité UI/µl	Temps (h)
Préculture boue	$3.00 \mathrm{x} 10^5$	$9.9x10^{9}$	$9.7x10^9$	0.34	12802	51
Préculture TSB	2.82x10 <sup>5</sup>	$3.4x10^9$	$3.1x10^9$	0.23	11215	51

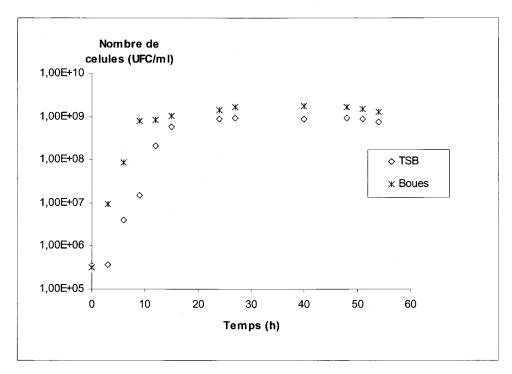


Figure 4.17 : Comparaison de la croissance de *Btk* dans le cas de deux milieux de préculture TSB et boues : Nombre de cellules en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)

(1) Lachhab et al. 2001

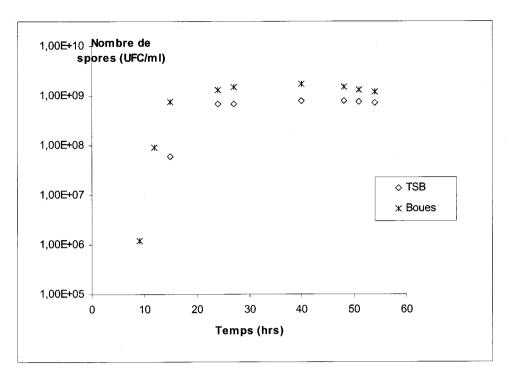


Figure 4.18 : Comparaison de la croissance de *Btk* dans deux milieux de préculture TSB et boue : Nombre de spores en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.23)

(1) Lachhab et al. (2001)

#### 4.3.2 Effets du pourcentage d'inoculum utilisé initialement

Au cours de cette étude le protocole expérimental décrit dans la section 3.2.5.2 à été suivi. Et la culture de *Bt* dans cette étude a été réalisée dans les boues mixtes de la CUQ, dont les caractéristiques physico-chimiques sont décrites en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 06/01/99), la concentration des ST dans ces boues est de 44 g/l. Le rapport C/N est évalué à 11.72. Il est important de noter qu'un seul échantillonnage des boues à été fait durant cette expérience afin d'éviter l'effet de la nature du substrat sur l'optimisation de l'inoculum.

Les résultats obtenus montrent que, le nombre final des cellules et des spores de Bt dépend du pourcentage de l'inoculum utilisé. Le nombre des cellules viables atteint  $2.2 \times 10^9$  UFC/ml dans le cas d'un pourcentage d'inoculum de 2%, et  $3.6 \times 10^9$  dans le cas de 3%. Ce dernier reste relativement faible dans le cas d'un pourcentage d'inoculum de 1% ( $3.5 \times 10^8$  UFC/ml), 4% ( $6.5 \times 10^8$  UFC/ml) et 5% ( $5.5 \times 10^8$  UFC/ml) (Tableau. 4.18). Les Figures 4.19 et 4.20 montrent

l'évolution du nombre de cellules et de spores dans le cas de 1%, 2% et 4% d'inoculum. Notons que les mêmes constatations ont été faîtes dans le cas de la souche *Bta* (Tableau 4.19).

Les résultats du test d'entomotoxicité ont par ailleurs montré au cours de cette expérience qu'un pourcentage d'inoculation de 2% permet d'obtenir un potentiel entomotoxique (12900  $IU/\mu l$ ) supérieur à celui des boues inoculées avec des pourcentages de 3%, 4% et 5% d'une suspension de Bt qui est respectivement de 11700  $IU/\mu l$ , 9710  $IU/\mu l$  et 8115  $IU/\mu l$ .

Tableau 4.18 : Comparaison du nombre de cellules et de spores *Btk* obtenu dans le cas de différent pourcentage d'inoculum (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.25)

	Cellules initiales	Cellules	Spores	Taux de croissance	% de sporulation	Toxicité	Temps
Pourcentage d'inoculation	(CFU/ml)	UFC/ml)	UFC/ml	spécifique (h <sup>-1</sup> )		UI/μl	(h)
1%	$4.5 \times 10^6$	$3.5x10^8$	$3.4x10^8$	0.2470	97	10300	52
2%	$9.1 \times 10^6$	$2.2x10^9$	$2.1 \times 10^9$	0.2324	96	12900	52
3%	$1.410^{7}$	$3.6x10^9$	$2.6x10^9$	0.1458	91	11700	52
4%	$1.9 \text{ x} 10^7$	$6.5 \times 10^8$	$6.2x10^{8}$	0.1229	89	9710	52
5%	$2.3x10^{7}$	5.5x10 <sup>8</sup>	5.3x10 <sup>8</sup>	0.1204	85	8115	52

Tableau 4.19: Comparaison du nombre de cellules et de spores *Bta* obtenu dans le cas de différent pourcentage d'inoculum (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.26)

	Cellules initiales	Cellules	Spores	Taux de croissance	% de sporulation	Toxicité	Temps
Pourcentage d'inoculation	(CFU/ml)	UFC/ml)	UFC/ml	spécifique (h <sup>-1</sup> )		UI/μl	(h)
1%	$1.4 x 10^6$	$8.4x10^{8}$	$8.2x10^{8}$	0.3171	98	12120	52
2%	$2.8x10^6$	$8.8x10^9$	8.4x10 <sup>9</sup>	0.2842	97	13000	52
3%	$4.20 \times 10^6$	$7.6 \text{x} 10^9$	$7.0x10^9$	0.24444	95	11910	52
4%	$5.60 \times 10^6$	$9.6 \text{x} 10^8$	$8.0 \text{x} 10^8$	0.2198	89	10250	52
5%	$7.00 \times 10^6$	$8.4x10^{8}$	$7.1 \text{x} 10^8$	0.1864	87	10110	52

<sup>(1)</sup> Lachhab et al. (2001)

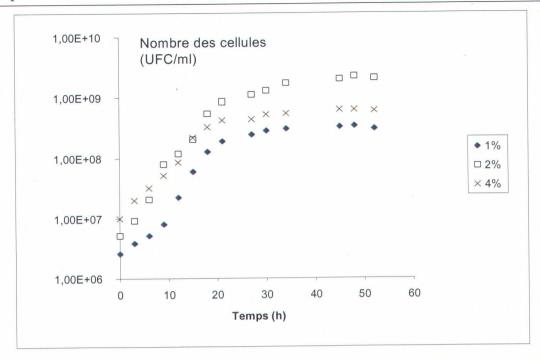


Figure 4.19: Comparaison de la croissance de *Btk* dans le cas de différent pourcentage (V/V) d'inoculum 1%, 2%, 4%: Nombre de cellules en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.25)

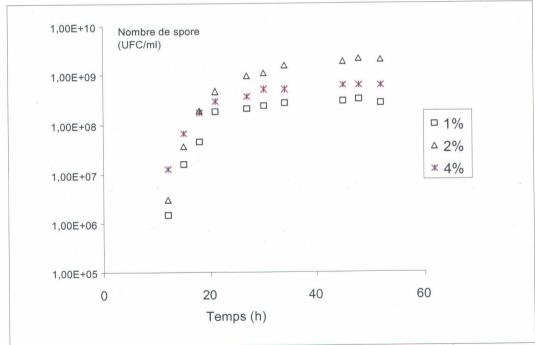


Figure 4.20: Comparaison de la croissance de *Btk* dans le cas de différents pourcentages (V/V) d'inoculum: 1%, 2%, 4%: Nombre de spores en fonction du temps (1) (Voir annexe VIII, Tableau 8.25)

(1) K. Lachhab et al. (2001)

### 4.4 Effets de la double inoculation sur la production de B. thuringiensis

L'utilisation de la double inoculation, technique développée au cours de ce travail, permet d'améliorer l'obtention des cellules et des spores de *Bta*. Dans les boues mixtes de la CUQ, qui ont été diluées pour obtenir une concentration des ST de 25 g/l. Il importe de signaler que les boues non diluées ont un rapport C/N de 10.07 et une concentrations de ST de 40 g/l (caractéristiques physico-chimiques en annexe I Tableau 8.2 (échantillonnage du 13/10/99)), des concentrations de cellules et de spores de 1.3x10<sup>11</sup> et 1.2x10<sup>11</sup> UFC/ml ont été atteintes. Cependant, ces concentrations étaient plus élevées dans le cas des boues d'amidon, elles sont de l'ordre de 1.2x10<sup>12</sup> UFC/ml et 1.1x10<sup>12</sup> UFC/ml (Figures 4.21 et 4.22). Il importe de noter que les boues d'amidon ont une concentration en ST de 26.3 g/l et un rapport C/N de 16.20 (caractéristiques physico-chimiques en annexe I, Tableau 8.5).

Les résultats de l'entomotoxicité (Tableau 4.20) montrent que la deuxième inoculation permet non seulement d'atteindre des concentrations de cellules et des spores très intéressantes mais également un potentiel entomotoxique élevé, il est de l'ordre de 13700 UI/µl dans le cas des boues de la CUQ et de 14984 UI/µl dans le cas des boues d'amidon.

Tableau 4.20: Comparaison de la croissance de *Bta* dans les boues de la CUQ et d'amidon: Nombre de cellules et de spores et potentiel entomotoxique dans le cas d'une inoculation vs deux inoculations (Voir annexe X, Tableau 8.28a et b)

Pourcentage	Cellules	Spores	Taux de	Temps de	Toxicité	Temps
d'inoculation			croissance spécifique	génération	,	
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(h <sup>-1</sup> )	<b>(h)</b>	UI/μl	(h)
CUQ avec une seule	$4.4x10^9$	$4.1x10^9$	0.2329	2.97	12400	72.
inoculation						
CUQ(avec une	$1.3x10^{11}$	$1.2x10^{11}$	0.26	2.66	13700	72
deuxième inoculation à						
24 h)						
Amidon avec une seule	$2.4x10^{10}$	$2.3x10^{10}$	0.2519	2.75	12900	72
inoculation						
Amidon (avec une	$1.2x10^{12}$	$1.1x10^{12}$	0.2542	2.72	14984	72
deuxième inoculation à						
24 h)						

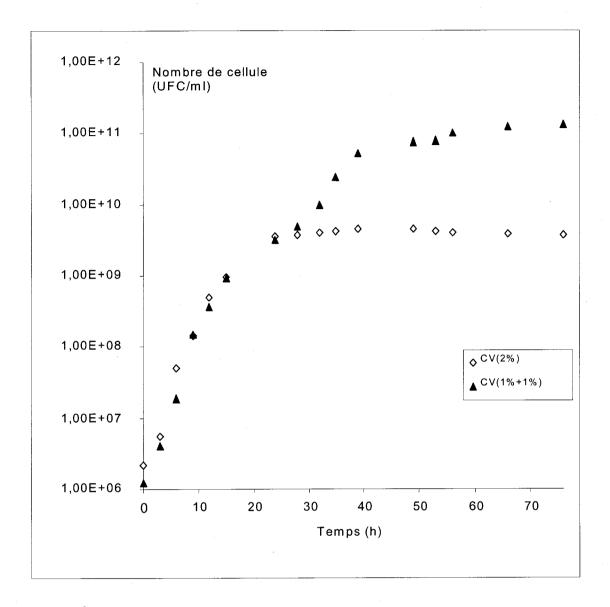


Figure 4.21 : Évolution de la croissance de *Bta* dans les boues de la CUQ et avec une deuxième inoculation et une seule inoculation : Nombre de cellules en fonction du temps (Voir annexe X, Tableau 8.28 a)

CV(1%+1%)

: Nombre de cellules de Bta dans le cas de deux inoculations

CV(2%)

: Nombre de cellules de Bta dans le cas d'une seule inoculation

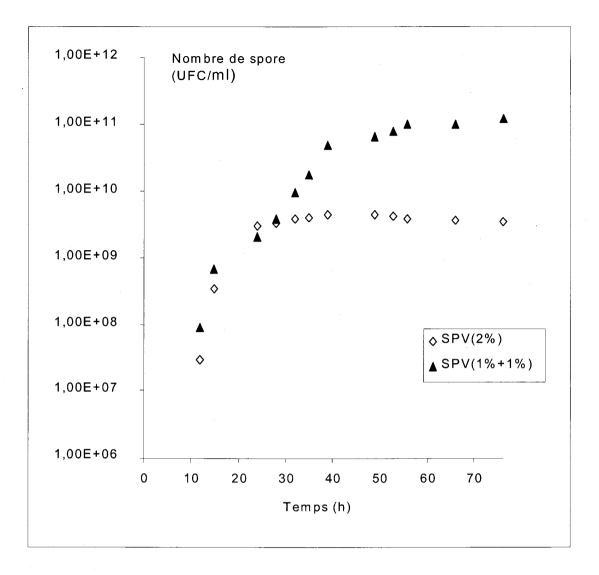


Figure 4.22: Évolution de la croissance de *Bta* dans les boues de la CUQ avec une deuxième inoculation et une seule inoculation: Nombre de spores en fonction du temps. (Voir annexe X, Tableau 8.28 a)

SPV(1%+1%) : Nombre de spores de Bta dans le cas de deux inoculations

SPV(2%) : Nombre de spores de *Bta* dans le cas d'une seule inoculation

### 4.4.1 Étude de la double inoculation dans le surnageant.

Les boues mixtes de la CUQ utilisées au cours de cette expérience présentent un rapport C/N de 10.07 et une concentrations de ST de 40 g/l (caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 13/10/99)). Elles ont été diluées pour obtenir une concentration des ST de 25 g/l. La réalisation d'une double inoculation dans le surnageant des boues mixtes de la CUQ et du milieu synthétique (soya) après 24 h de fermentation du premier inoculant (voir méthodologie section 3.2.6.2), permet de monter que le surnageant des boues de la CUQ recueilli après une première phase de fermentation est encore capable de supporter la croissance et la sporulation de Bt. Le nombre de cellules obtenues est de l'ordre de  $4.3 \times 10^7$  UFC/ml dans le cas des boues et  $7.5 \times 10^6$  UFC/ml dans le cas du milieu soya (Tableau 4.21).

Les tests d'entomotoxicité permettent de déterminer un potentiel entomotoxique de 7827 UI/µl dans le cas de l'utilisation du surnageant des boues de la CUQ comme milieu de culture; ce dernier étant plus élevé que celui obtenu dans le surnageant du milieu soya qui est de 5450 UI/µl. Finalement, l'étude de la croissance de *Bt* et de son entomotoxicité dans le surnageant des boues de la CUQ et du milieu synthétique montre que les deux milieux de cultures supportent bien la croissance de *Bt* après une première fermentation de 24 h.

Tableau 4.21: Étude de la croissance de *Bt* dans le surnageant des boues et du milieu soya après 24 h de fermentation (Voir annexe X-1, Tableau 8.29)

Pourcentage d'inoculation	Concentration initiale (UFC/ml)	Cellules	Spores	Temps de génération 1 <sup>ére</sup>	Temps de génération 2 <sup>ème</sup> inoculation	Toxicité	Temps
	(	UFC/ml	UFC/ml	inoculation h	h	UI/μl	h
Boues CUQ (2 inoculations de 1% chacune)	$3.7 \times 10^5$	$1.4x10^{12}$	1.13x10 <sup>12</sup>	2.40	5.6	14151	72
Boues de la CUQ (une seule inoculation de 2%)	$3.9x10^5$	7.5x10 <sup>9</sup>	7.3x10 <sup>9</sup>	2.25	-	12530	52
Surnageant des Boues CUQ (une seule	$4.2 \times 10^5$	4.3x10 <sup>7</sup>	$4.0x10^7$	5.5	-	7827	52
inoculation de 1%) Soya (2 inoculations de 1% chacune)	$4.2 \times 10^5$	2.9x10 <sup>11</sup>	$2.0x10^{11}$	2.12	5.9	13048	. 72
Soya ( une seul inoculum de 2%)	$4.5 \times 10^5$	$6.2x10^9$	5.8x10 <sup>9</sup>	2.65	-	12480	52
Surnageant de soya (inoculation 1%)	5x10 <sup>5</sup>	$7.5 \times 10^6$	6.7x10 <sup>6</sup>	6.4	-	5450	52

### 4.4.2 Étude de l'effet de différent pourcentage d'inoculum dans le cas d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de *Btk*

La comparaison de la croissance des cellules et des spores de *Bt* dans les boues mixtes de la CUQ dans le cas de la double inoculation avec différent pourcentage d'inoculum montre qu'un pourcentage de 1.5 % d'une suspension d'environ 4.8x10<sup>5</sup> de *Bt* inoculé deux fois à un intervalle de 24 h permet d'atteindre une meilleure croissance des cellules et des spores de *Bt* dans les boues. Cependant, il n'y a pas une grande différence entre le potentiel entomotoxique dans le cas de la réalisation de deux inoculations à raison de 1.5% et celle à raison de 1% (Tableau 4.22). Les concentrations finales des cellules et des spores sont respectivement de 8.8x10<sup>12</sup> UFC/ml, 8.4x10<sup>12</sup> UFC/ml dans le cas de 1.5 % et de 3.9x10<sup>12</sup> UFC/ml, 2.5x10<sup>12</sup> UFC/ml dans le cas de 1%. Dans le cas de l'utilisation d'un inoculum de 1.5% dans les boues de la CUQ, les résultats du test d'entomotoxicité permettent d'obtenir un potentiel entomotoxique de 15989 UI/μl. Tandis qu'il est de 15860 UI/μl dans le cas de 1%. Cette amélioration de 2.4% est négligeable si on tient compte de l'erreur qui est de 7.3%. Un inoculant d'environ 1% donne donc de meilleurs résultats que 2% ou 3%. L'entomotoxicité dans ces deux derniers cas est inférieure à 12900 UI/μl (Tableau 4.22).

Les boues utilisées au cours de cette expérience ont une concentration des ST de 40 g/l et un rapport C/N de 10.07 (caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.1 (échantillon du 11/01/00). Elles ont été diluées pour obtenir une concentration des ST de 25 g/l.

Tableau 4.22: Comparaison de la croissance de *Bt* dans le cas de la double inoculation de 1% et 1,5% et avec la croissance de *Bt* dans le cas d'une seule inoculation de 2% et de 3% (Voir annexe X-2, Tableau 8.30)

Pourcentage d'inoculation	Concentration initiale	Cellules	Spores	Temps de génération 1 <sup>ére</sup> inoculation	Temps de génération 2 <sup>ème</sup> inoculation	Toxicité	Temps
	(UFC/ml).	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(h)	(h)	UI/μl	(h)
CUQ (avec une deuxième	$4.8 \times 10^{5}$	$3.9x10^{12}$	2.5x10 <sup>12</sup>	2.27	4.63	15860	52
inoculation 1%) CUQ (avec une deuxième	$7.3 \times 10^{5}$	8.8x10 <sup>12</sup>	$8.4 \times 10^{12}$	2.25	5.04	15989	52
inoculation 1,5%) CUQ (avec une seule inoculation 2%)	9.5x10 <sup>5</sup>	$2.7x10^{10}$	2.5x10 <sup>10</sup>	2.29	-	12889	52
CUQ (avec une seule inoculation 3%)	1.6x10 <sup>6</sup>	$3.7x10^{10}$	$3.1 \times 10^{10}$	2.28	· -	12289	52

### 4.4.3 Effet du temps de la deuxième inoculation sur la croissance et la toxicité de Btk

Les boues utilisées au cours de cette expérience ont une concentration des ST de 40 g/l et un rapport C/N de 10.07 (caractéristiques physico-chimiques en annexe I Tableau 8.1 (échantillon du 11/01/00)). Elles ont été diluées pour obtenir une concentration des ST de 25g/l.

La comparaison de la croissance des cellules et des spores dans le cas de la double inoculation à différentes périodes de temps à savoir 15h, 24h, 36h, 48h révèle que la réalisation de la deuxième inoculation après 15h de fermentation permet d'obtenir les meilleurs résultats. Les concentrations des cellules et des spores sont respectivement de  $3.1 \times 10^{12}$  UFC/ml,  $3.0 \times 10^{12}$  UFC/ml, dans le cas de la réalisation de la deuxième inoculation après 36h, 48h le nombre de cellules sont respectivement de  $8.8 \times 10^{11}$  UFC/ml et  $2.5 \times 10^{11}$  UFC/ml (Tableau 4.23). Les mesures du potentiel entomotoxique donnent des valeurs de 15011 UI/ $\mu$ l pour un temps de 15h, de 14649 UI/ $\mu$ l dans le cas de 36h et de 13319 UI/ $\mu$ l dans le cas de 48h. De plus, la réalisation de la deuxième inoculation après 36h ou 48h entraînera nécessairement une prolongation du temps de fermentation.

Tableau 4.23: Comparaison de la croissance de *Bt* dans le cas de deux inoculations, la deuxième inoculation est réalisée après 15h, 24 h, 36h, et 48 de fermentation (Voir annexe X-2, Tableau 8.31)

Pourcentage	Concentration	Cellules	Spores	Temps de	Temps de	Toxicité	Temps
d'inoculation	initiale (UFC/ml)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	génération 1 <sup>ére</sup> inoculation (h)	génération 2 <sup>ème</sup> inoculation (h)	UI/μl	(h)
Boues de la CUQ avec une seule	3.3x10 <sup>6</sup>	2.6x10 <sup>10</sup>	2.1x10 <sup>10</sup>	2.33	-	12980	72
inoculation de 2% Boues CUQ Deuxième inoculation à 15h	1.6x10 <sup>6</sup>	$3.1x10^{12}$	$3.0x10^{12}$	2.34	3.90	15011	72
Boues CUQ Deuxième inoculation à 24h	1.4x10 <sup>6</sup>	$2.6 \times 10^{12}$	$2.1 \times 10^{12}$	2.36	3.96	14950	72
Boues CUQ Deuxième inoculation à 36h	$1.8 \text{x} 10^6$	8.8x10 <sup>11</sup>	7.5x10 <sup>11</sup>	2.35	4.64	14649	72
Boues CUQ Deuxième inoculation à 48h	1.6x10 <sup>6</sup>	2.5x10 <sup>11</sup>	2.4x10 <sup>11</sup>	2.38	5.26	13319	72

# 4.4.4 Étude de l'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes (voir méthodologie section 3.2.6.7) sur la deuxième inoculation

Le Tableau 4.24 résume les résultats du nombre de cellules et de spores ainsi que du potentiel entomotoxique de *Btk* cultivée dans les boues mixtes de la CUQ avec ou sans traitement enzymatique dans le cas de la deuxième inoculation. Les boues utilisées au cours de cette expérience ont une concentration des ST de 40 g/l et un rapport C/N de 10.07 (caractéristiques physico-chimiques en annexe I, Tableau 8.1 (échantillonnage du 11/01/00)).

L'étude de la croissance de Bt dans le cas de la deuxième inoculation dans les boues hydrolysées à l'aide de l'enzyme KamiZym-D, permet de constater que le nombre de cellules et de spores est plus élevé dans le cas des boues avec traitement. Cependant, cette différence reste faible vu que l'écart-type est de 7.3%. Le nombre des cellules a atteint une valeur de  $6.4 \times 10^{12}$  dans le cas des boues avec hydrolyse et  $7.5 \times 10^{11}$  UFC/ml dans le cas des boues sans hydrolyse. Le potentiel entomotoxique est respectivement de 15143 UI/ $\mu$ l et 14910 UI/ $\mu$ l.

Tableau 4.24 : L'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la deuxième inoculation (Voir annexe X-2, Tableau 8.33)

	Concentrati on initiale de cellules	i Nombre de cellules	Nombre de spores	Temps de génération 1 <sup>ére</sup>	2ème		Temps
	(UFC/ml)	(UFC/ml)	(UFC/ml)	inoculation (h)	inoculation (h)	UI/μl	(h)
Boue de la CUQ (1%)	1,11x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>9</sup>	3.5x10 <sup>9</sup>	2.80	-	12522	56
Boue de la CUQ (1%+1%) (24 h)	$1,20x10^6$	7.5x10 <sup>11</sup>	$7.00 \text{x} 10^{11}$	2.7	4.9	14943	56
Boue de la CUQ avec hydrolyse enzymatique	$1,20x10^6$	$6.4x10^{12}$	$6.3x10^{12}$	2.2	4.40	15140	56
(1%+1%) (24 h) Boue de la CUQ avec hydrolyse enzymatique (1%)	1,40x10 <sup>6</sup>	2.8x10 <sup>10</sup>	2.65x10 <sup>10</sup>	2.24	<u>-</u>	12971	56

### 4.4.5 Étude de l'effet de la concentration des solides totaux dans les boues sur la deuxième inoculation

L'expérience a été réalisée en suivant le protocole expérimental décrit dans la section 3.2.9.4. Les boues utilisées au cours de cette expérience ont une concentration des ST de 40 g/l et un rapport C/N de 10.07 (caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.1

(échantillonnage du 11/01/00)). La comparaison de la croissance des cellules et des spores dans le cas de la deuxième inoculation avec différentes concentrations des solides totaux dans les boues, à savoir 25 g/l, 35g/l et 45g/l révèle qu'une concentration de 35 g/l permet d'atteindre une meilleure croissance des cellules et des spores dans les boues, par rapport à un pourcentage de 25 ou 45 g/l (Tableau 4.25). La concentration finale des cellules et des spores est respectivement de 3.9x10<sup>12</sup> UFC/ml, 3.7x10<sup>12</sup> UFC/ml dans le cas de 35 g/l et de 8.5x10<sup>11</sup> UFC/ml, 8.3x10<sup>11</sup> UFC/ml dans le cas de 45 g/l. Il faut signaler que le pourcentage de sporulation a été plus élevé dans le cas d'une concentration de ST de 25 g/l et 35 g/l, il est respectivement de 97%, 98%. Il a atteint 95% dans le cas de l'utilisation des boues avec une concentration de ST de 45 g/l.

La mesure de l'entomotoxicité établit le potentiel entomotoxique de 15580 UI/µl dans le cas de l'utilisation d'une concentration de ST de 35g/l dans les boues de la CUQ, de 14029 UI/µl dans le cas de 45 g/l et de 14320 UI/µl dans le cas de 25g/l. En somme, les boues dont la concentration des solides totaux est de 35 g/l permettent une meilleure croissance de *Bt* dans le cas de la double inoculation.

Tableau 4.25: Comparaison de la quantité de cellules et de spores viables *Btk* obtenue par fermentation dans les boues mixtes de la CUQ dans le cas de l'utilisation de deux inoculations (Voir annexe X-2, Tableau 8.32)

Pourcentage d'inoculation	Cellules initiales	Cellules viables	Spores viables	Temps de génération 1 <sup>ére</sup> inoculation	Temps de génération 2 <sup>ème</sup> inoculation	Toxicité	Temps
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	(h)	(h)	UI/µl (1)	(h)
25g/l	$1.37x10^5$	$7.8 \times 10^{11}$	$7.6 \text{x} 10^{11}$	2.13	4.17	14320	52
35 g/l	1.18x10 <sup>5</sup>	$3.9x10^{12}$	$3.7x10^{12}$	2.26	3.81	15580	52
45 g/l	$1.50 \text{x} 10^5$	$8.5x10^{11}$	$8.3x10^{11}$	2.61	3.23	14029	52

### 4.4.6 Analyse comparative des deux types d'inoculum

L'analyse comparative a été réalisée selon la méthodologie décrite dans la section 3.2.6.8. Tout d'abord, pour la validité du test, la normalité ainsi que la variabilité des résidus ont été vérifiées et respectées. L'étude de variance lors de l'analyse comparative entre les deux types d'inoculation à savoir la technique de deux inoculations de 1% chacune et celle d'une seule

inoculation de 2%, dont les résultats sont présentés en Annexe XI, Tableau 8.43, permet de constater une différence significative (Pr> F est de 0.0001) entre les résultats de la concentration des cellules ainsi que celles de l'entomotoxicité de ces deux techniques d'inoculation (Tableau 4.26). Une différence significative est également constatée dans le cas de la méthode à deux inoculations de 1% chacune entre le milieu soya et les boues de la CUQ. Les résultats permettent également de constater que la différence entre les deux milieux n'a pas été significative dans le cas d'une seule inoculation de 2% (Pr>F est de 0.0713, cas de l'entomotoxicité (Tableau 4.28). Les tableaux 4.27et 4.29 regroupent les moyennes des différents traitements.

Tableau 4.26: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de *Btk* dans le cas des deux types d'inoculation dans les boues de la CUQ (Nombre de cellules).

	Valeur de F	Pr>F
Milieu (soya vs boue)	19.44	0.0002
Méthodes ((1%+1%) vs 2%)	86.98	< 0.0001
Boue/(1%+1%)-2%	100.45	< 0.0001
oya/(1%+1%)-2%	10.03	0.0042
1%+1%)/Boue-Soya	42.84	< 0.0001
(2%)/Boue-soya*	0.10	0.7590*

<sup>\*</sup> La différence entre les deux milieux n'est pas significative dans le cas de 2%

Tableau 4.27 : L'intervalle de confiance dans le cas du nombre de cellules calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions

Milieux	Méthodes	Moyennes	Moy-inférieures	Moy-supérieures
Boue		5.65 <sup>E</sup> +10	3.07 <sup>E</sup> +10	1.04 <sup>E</sup> +11
Soya		$1.10^{E} + 10$	$6.03^{E} + 9$	2.03 <sup>E</sup> +10
	1%+1%	1.40 <sup>E</sup> +11	7.63 <sup>E</sup> +10	2.57 <sup>E</sup> +11
	2%	4.47 <sup>E</sup> +9	2.43 <sup>E</sup> +9	8.21 <sup>E</sup> +9
Boue	1%+1%	7.74 <sup>E</sup> +11	3.43 <sup>E</sup> +11	1.75 <sup>E</sup> +12
Boue	2%	$4.12^{E}+9$	1.83 <sup>E</sup> +9	9.29 <sup>E</sup> +9
Soya	1%+1%	$2.53^{E}+10$	1.12 <sup>E</sup> +10	5.71 <sup>E</sup> +10
Soya	2%	4.85 <sup>E</sup> +9	2.15 <sup>E</sup> +9	1.09 <sup>E</sup> +10

Tableau 4.28: Résultats de l'étude statistique dans le cas de la comparaison de la culture de *Btk* dans le cas des deux types d'inoculation dans les boues de la CUQ (cas de l'entomotoxicité)

	Valeur de F	Pr.>F
Boue/(1%+1%)-2%	76.15	<0.0001
Soya/(1%+1%)-2%	31.14	< 0.0001
(1%+1%)/Boue-Soya	25.33	< 0.0001
2%/Boue-soya*	3.56	0.0713

<sup>\*</sup> La différence entre les deux milieux n'est pas significative dans le cas de 2%

Tableau 4.29: Intervalle de confiance dans le cas de l'entomotoxicité calculé avec une limite de confiance de 95% pour les différents traitements et leurs interactions

Milieux	Méthodes	Moyennes	Moy-inférieures	Moy-supérieures
Boue		13214	12649	13778
Soya		12141	11576	12706
	1%	13786	13222	14351
	2%	11568	11004	12133
Boue	1%	14567	13918	15216
Boue	2%	11861	11212	12510
Soya	1%	13006	12357	13655
Soya	2%	11276	10627	11925

# 4.4.7 Résultat de l'application de la deuxième inoculation dans les bioréacteurs 15A, 15B en utilisant les boues secondaires de la CUQ

Les paramètres utilisés au cours de l'application de la deuxième inoculation dans les fermenteurs 15A et 15B sont regroupés dans le Tableau 4.30. Les boues utilisées au cours de cette expérience sont des boues secondaires de la CUQ dont la concentration des ST est de 29.7 g/l et le rapport C/N est de 9.7 (caractéristiques physico-chimiques en Annexe I, Tableau 8.3 (échantillonnage du 01/09/00)).

Tableau 4.30: Paramètres à utiliser au cours de la fermentation

	Agitation (rpm)	ST (g/l)	% inoculum	Temps d'inoculation
15B	350	35 g/l	1%+1%	À 0 h et 15 h
15A	350	35 g/l	2%	0h

Dans cette partie, une deuxième inoculation a permis d'accroître l'obtention des cellules et des spores (Figure 4.23) de Bt. On a pu atteindre respectivement dans le cas de la deuxième inoculation, des concentrations de cellules et de spores de  $3.8 \times 10^{11}$  et  $3.7 \times 10^{11}$  UFC/ml. Cependant, dans le cas d'une seule inoculation on a respectivement des concentrations de  $5.8 \times 10^9$  et  $5.6 \times 10^9$  UFC/ml (Tableau 4.31).

Les résultats de l'entomotoxicité montrent que la deuxième inoculation a permis d'obtenir également un meilleur potentiel entomotoxique; il est de l'ordre de 15821 UI/µl dans le cas de deux inoculations et de 12940 UI/µl dans le cas d'une seule inoculation.

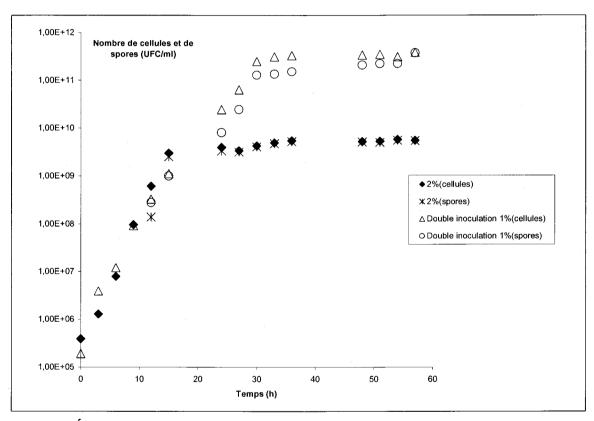


Figure 4.23: Évolution de la croissance de Bt dans les boues secondaires de la CUQ avec une deuxième inoculation et une seule inoculation : Nombre de cellules et de spores en fonction du temps (Voir annexe X-4, Tableau 8.38)

Tableau 4.31 : Résultat de l'application des résultats dans	les fermenteurs 15A et 15B
---	----------------------------

Pourcentage d'inoculation	Cellules	Spores viables	Taux de croissance spécifique	Taux de croissance spécifique	% de sporulation	Toxicité	Temps
	UFC/ml	UFC/ml	$(h^{-1})$	( <b>h</b> <sup>-1</sup> )	%	UI/μl (1)	(h)
2%	5.8x10 <sup>9</sup>	5.6x10 <sup>9</sup>	0.27	-	97	12940	57
1%+1%	3.8x10 <sup>11</sup>	3.7x10 <sup>11</sup>	0.28 (1 <sup>ere</sup> inoculation)	0.14 (2 <sup>eme</sup> inoculation)	98	15821	57

### 4.4.8 Étude de l'évolution de l'oxygène dans le cas de la deuxième inoculation

Les résultats de l'expérience réalisée en suivant le protocole décrit dans la section (3.2.6.6), permettent de constater que la concentration d'oxygène diminue au cours de la croissance exponentielle. Elle atteint son minimum au tour de 10 h de fermentation, période où la sporulation commence. Après, la concentration de O<sub>2</sub> dans le milieu de culture augmente; elle se stabilise autour de 9 ppm après 24h de fermentation dans le cas d'une seule inoculation de 2% et de 7 ppm dans le cas de deux inoculations après 30 h de fermentation. La Figure 4.24 montre que la consommation de O<sub>2</sub> dans le cas de la souche *Btk* avec deux inoculations redescend une deuxième fois après 20 h de fermentation. Par ailleurs, il faut signaler que dans le cas de deux inoculations, la concentration de O<sub>2</sub> dans le milieu de culture reste toujours supérieure à 4 ppm. Ce qui n'est pas le cas d'une seule inoculation avec 2% d'inoculum, alors que la concentration de O<sub>2</sub> descend jusqu'à un minimum d'environ 2 ppm.

Le suivi de la concentration de  $O_2$  montre la présence d'une seconde diminution dans le cas de la deuxième inoculation, avec un taux de croissance spécifique plus faible par rapport à la première diminution. Dans le cas d'une seule inoculation, la concentration de  $O_2$  diminue de 8 à 2 ppm après 10h et remonte jusqu'à un maximum de 9 ppm après 25h; alors que la double inoculation permet d'obtenir une concentration de  $O_2$  qui fluctue entre 7.5 et 5 ppm (Figure 4.24).

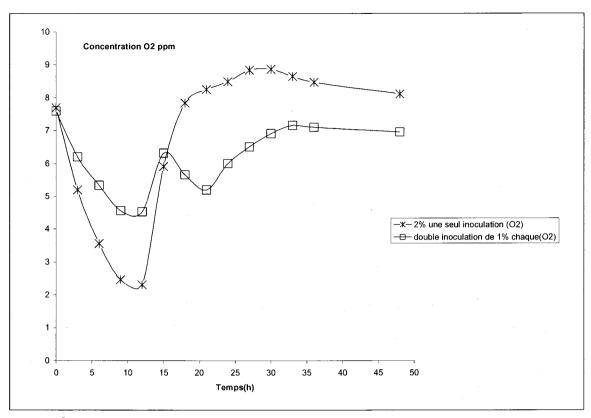


Figure 4.24 : Évolution de la concentration de l'oxygène contenu dans les boues de la CUQ durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : Comparaison des deux méthodes d'inoculation (souche *Btk*) (Voir annexe X-4, Tableau 8.39)

### 4.4.9 Évolution du pH dans le cas de la deuxième inoculation

L'étude de l'évolution du pH dans le cas des deux méthodes d'inoculation a été réalisée selon le protocole expérimental de la section (3.2.6.6). Cette étude montre que le pH, après avoir chuté jusqu'aux environs 6, remonte autour de 8 dans les deux cas. Au cours de la deuxième inoculation le pH rechute à environ 6.8 après 15 h de fermentation. Il remonte ensuite à 8.5 (Figure 4.25).

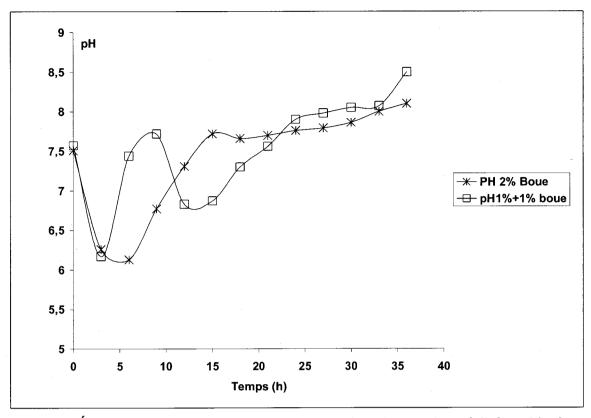


Figure 4.25 : Évolution du pH dans le cas de la deuxième inoculation réalisé en bioréacteur : Comparaison avec une seule inoculation (Voir annexe X-4, Tableau 8.39)

### 4.4.10 Étude de l'évolution des solides totaux dans les boues secondaires au cours de la fermentation de *Bt*.

L'étude de l'évolution des solides totaux en fonction du temps, réalisée selon la méthodologie décrite dans la section 3.2.6.4, montre une diminution de ces derniers dans les deux cas, avec ou sans deuxième inoculation (Figure 4.26). Cela est, cependant, plus élevé dans le cas de la double inoculation. La concentration des ST est passée de 30.4g/l à 25.1g/l. Cette diminution est estimée à 19% alors qu'elle est de 8.8% dans le cas d'une seule inoculation, la concentration des ST est passée de 30.3g/l à 27.7g/l.

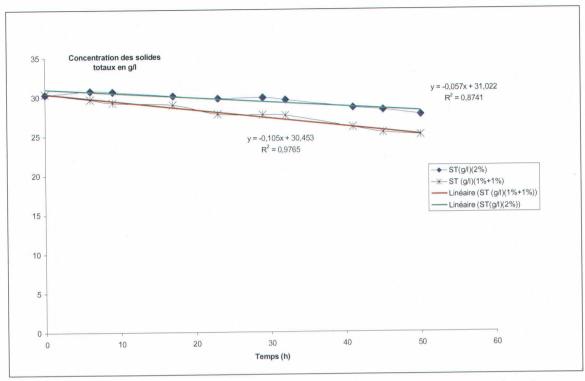


Figure 4.26: Évolution des solides totaux dans les boues secondaires en fonction du temps de fermentation (Voir annexe X-4, Tableau 8.41)

ST(g/)15A : la concentration des solides totaux dans les boues de la CUQ au cours de la fermentation en bioréacteur 15A (cas d'une seule inoculation de 2%).

ST(g/)15B: la concentration des solides totaux dans les boues de la CUQ au cours de la

fermentation en bioréacteur 15B (cas de la double inoculation).

# 4.4.11 Étude de l'évolution de la concentration du carbone dans le cas de la double inoculation

La biodégradation de la matière organique par les bactéries réduit la quantité de carbone présent dans le milieu de culture. L'étude de l'évolution du carbone total (Figure 4.27) montre que les deux courbes suivent une tendance plutôt linéaire tout en diminuant vers la fin de la fermentation. Le coefficient de détermination R2 était de l'ordre de 0.97 dans le cas de deux inoculations chacune 1% et de 0.96 dans le cas d'une seule inoculation de 2%. La courbe de tendance dans le cas de la deuxième inoculation a une pente plus faible que celle d'une seule inoculation. Elles sont respectivement de 0.0595 et 0.0637.

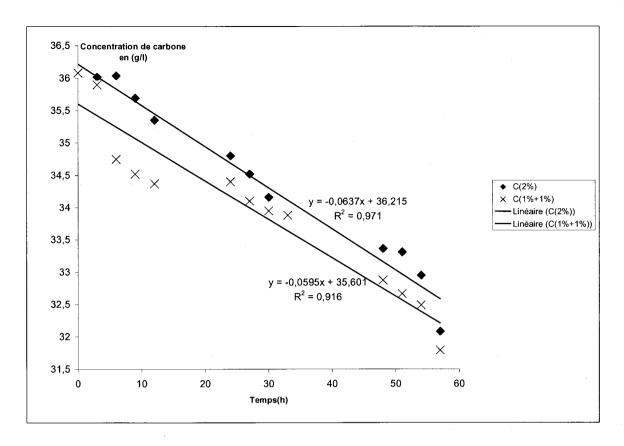


Figure 4.27: Étude de l'évolution du carbone total dans le cas de la deuxième inoculation et comparaison avec celle ou une seule inoculation de 2% a été faite (Voir annexe X-4, Tableau 8.40)

C(1%+1%): Concentration du carbone des échantillons dans le cas de deux inoculations 1% chacune

C(2%): Concentration du carbone des échantillons dans le cas d'une seule inoculation de 2%

### 4.4.12 Étude de l'activité protéolytique de Bt dans le cas de la deuxième inoculation

L'activité enzymatique est exprimée en UI/ml. Une unité d'enzyme hydrolyse la caséine pour produire la coloration équivalente à 1,0 µmole de tyrosine par minute à pH 8,2 et à 37°C. J' ai alors divisé par 10 les valeurs de tyosines obtenues, car j'ai fait une incubation de 10 min. j'ai porté les résultats de l'activité enzymatiques (U.I./ml) aux Figures 4.28 et 4.29.

Afin de suivre l'activité des protéases alcalines produites par Bt sur des milieux aussi complexes que les boues des eaux usées, j'ai procédé à l'évaluation de la croissance cellule de Bt et à l'estimation de leur activité protéolytique. L'étude de l'activité protéolytique (AP), indique que ces deux méthodes présenteraient des pics d'activités qui apparaissent à des temps différents. De plus, dans le cas d'une seule inoculation le maximum de l'activité protéolytique de AP=1.6

est obtenu après 20 h de fermentation. Alors que dans le cas de deux inoculations de 1% chacune, il a pu atteindre des valeurs de l'ordre de AP=1.96 après 48 h de fermentation (Figure 4.28). L'activité protéolytique est plus faible dans le cas de la double inoculation pour les deux milieux (boue et soya) au début de la fermentation, elle a augmenté au tour de 48h. De plus, la plus faible activité dans le cas de deux inoculations est observée sur le milieu soya (Figure 4.29).

Il faut noter que la concentration des cellules et des spores de Bt atteint dans le cas des boues secondaires de la CUQ (dont les caractéristiques physico-chimiques sont en Annexe I Tableau 8.3) avec deux inoculations est de 2.7 1011 et 2.56 1011 UFC/ml, celle dans le cas du milieu soya est de 4.5x1010 et 4.3x1010 UFC/ml (Voir annexe X-3, Tableau 8.37).

À travers les résultats obtenus au cours de ce travail, je constate que l'activité protéolytique n'est pas stable, avec des pics à différentes périodes de temps. De plus, j'ai constaté que la plus faible activité dans le cas de deux inoculations est observée sur le milieu soya (Figure 4.29).

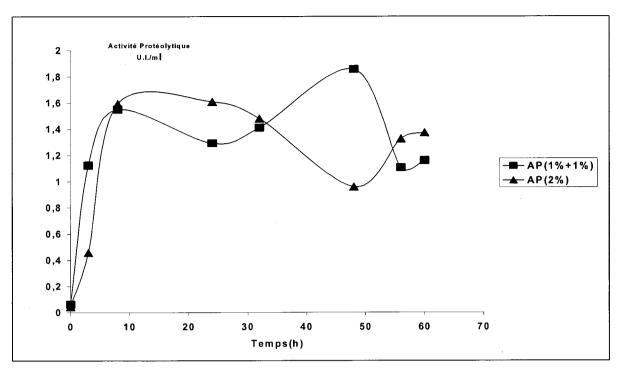


Figure 4.28 : Activité protéolytique (UI/ml) dans le cas d'une seule inoculation de 2% et dans le cas de deux inoculations chacune de 1% (Voir annexe X-3, Tableau 8.35)

AP (1%+1%): activité protéolytique dans le cas de deux inoculations chacune de 1% AP(2%): activité protéolytique dans le cas d'une seule inoculation de 2%

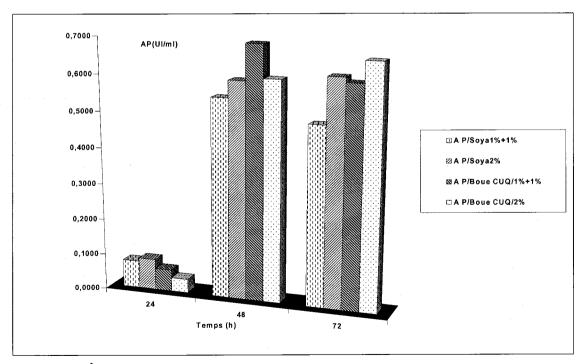


Figure 4.29 : Évolution de l'activité protéolytique dans le milieu soya et dans les boues de la CUQ : Cas de la deuxième inoculation (Voir annexe X-3, Tableau 8.36)

# CHAPITRE 5 et 6 DISCUSSIONS



### 5 DISCUSSIONS SPÉCIFIQUES

# 5.1 Effet de souches naturelles de Bt : Comparaison de la croissance de deux souches Btk, Bta dans les boues mixtes de la CUQ en fermenteur

La recherche de souches naturelles de B. thringiensis dans différents biotopes est bien documentée dans la littérature. Des études de Chaufaux et al. (1997) ont permis d'isoler 1260 souches de ce bacille à partir de 4887 échantillons de nature diverse. Un nombre important de ces souches sont actives sur les larves de lépidoptères. Il serait donc important d'utiliser une souche isolée à partir des boues et de comparer sa croissance et son entomotoxicité à celle de la souche de référence. Bta une souche sauvage isolée à l'INRS-ETE, à partir des boues de l'usine de traitement des eaux de la CUQ qui présente les caractéristiques d'une bactérie sporulante. Elle appartient à l'espèce B. thuringiensis, par la présence des gènes CryIA portant l'information de la toxine protéique. Bta possède également le gène CryIA(a) et le gène CryIC(a) ce qui lui confère le pouvoir entomotoxique contre les Lépidoptères et les coléoptères. Des études de Préfontaine et al. (1987) et Höfte et Whiteley (1989) ont montré que l'activité entomotoxique des cristaux produits par Bt pendant la sporulation est codée par des gènes CryIA(a), CryIA(b) et CryIA(c). Cela a été confirmé par des bioessais. Bt peut donc être cultivé dans les boues d'épuration sans que ses caractéristiques génétiques ne soient affectées au niveau des gènes CryIA.

La culture de Bta et de Btk (souche de référence) dans les boues mixtes de la CUQ a permis de constater que la souche Bta croît plus rapidement dans les boues en comparaison avec Btk. Le taux de croissance spécifique dans le cas de Bta est de 0.42 h-1 alors qu'il est de 0.33 h-1 dans le cas de Btk. La mesure du potentiel entomotoxique a permis de confirmer ces résultats.

L'analyse de la variance lors de l'étude statistique du nombre de cellules et de l'entomotoxicité de Bta et de Btk, permet de constater une différence significative entre les résultats des deux souches. On peut également constater un effet significatif du milieu (boue mixte de CUQ ou le milieu synthétique) sur la croissance de la souche Bta, alors que ce n'est pas le cas pour Btk. Cela peut être expliqué par le fait que Bta, souche sauvage isolée à partir des boues et cultivée dans les boues, n'a pas besoin de période d'acclimatation pour bien croître; la phase de latence dans ce cas est réduite. Pearson et Ward (1988) affirment que l'activité entomotoxique peut varier selon la variété de Bt utilisée. Notons que ces résultats ont également été vérifiés dans le cas du potentiel entomotoxique.

Le suivi de O2 et CO2 a permis de montrer qu'au début de la fermentation, la concentration de O2 a diminué; en même temps on assiste à une augmentation de la concentration de CO2. En effet Bt utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons pour oxyder en CO2 les métabolites produits en fermentation (Vadeboncoeur, 1997).

Notons également que la production de CO2 dans le cas de la souche Bta est plus importante par rapport à celle de la souche Btk, malgré la phase de latence observée au début de la fermentation. Des études de (Wayman et Pareckh, 1990) montrent que la phase de latence est particulièrement influencée par la quantité d'inoculum, l'âge de la préculture et la composition du milieu. De même, la consommation d'oxygène est supérieure dans le cas de Bta. Cela peut s'expliquer par la forte prolifération bactérienne. L'oxygène joue un rôle important dans les procédés de fermentation (Sachdeva et al., 1999); il a un effet direct sur la croissance et la sporulation de Bt. Un taux élevé d'aération est nécessaire pour maximiser la croissance de cellules, la sporulation et la production de δ-endotoxine par Bt (Foda et al., 1985; Sachdeva et al., 1999). La concentration de O2 diminue au fur et à mesure que le nombre de cellules croit, processus bien connu dans le cas de bactéries aérobies (Stanier et al., 1966). Ces mesures permettent donc de confirmer les résultats de la comparaison des deux souches, montrant que le taux de croissance spécifique de Bta dans les boues est plus élevé que celui de Btk.

# 5.2 Effet du milieu de culture, des différents types de traitement et d'ajout de nutriments sur la croissance et l'entomotoxicité

# 5.2.1 Étude préliminaire : Comparaison de la croissance de *Bt*k dans les boues mixtes de la CUQ et le milieu synthétique à base de farine de soya

Le facteur fondamental pour le succès de la commercialisation du biopesticide Bt est un milieu adéquat de culture. Comme je l'ai déjà mentionné, Bt peut se développer dans un substrat contenant de l'eau, des sources de carbone et d'azote ainsi que des minéraux, sans oublier que les conditions de pH, de température et d'aération doivent être favorables à la croissance et la sporulation de Bt (Lisansky et al., 1993). L'utilisation des boues a montré ses capacités à supporter la croissance et la sporulation ainsi qu'à la production de la δ-endotoxine (Tirado-Montiel, 1997).

Les premiers essais réalisés au cours de cette étude sans optimisation des facteurs pouvant influencer la production de Bt dans les boues ont permis de constater que la culture de Bt dans les boues peut être comparée à la culture de Bt en milieu synthétique (Soya) quoique légèrement moins performante. L'entomotoxicité est plus élevée dans le cas du milieu soya. Cela peut être dû d'une part, au faible transfert de O2 de la phase gazeuse à la phase liquide, et d'autre part, à la faible mobilité des bactéries. Ces deux facteurs sont particulièrement affectés par la forte concentration des ST (46 g/l) et la forte viscosité des boues. Des études de Rossa et al. (1992) ont montré que l'endotoxine et la sporulation diminuent sous des conditions d'oxygénation limitée.

En somme, la réalisation de ces premiers essais en fermenteurs et en erlenmeyer, dans le but de faire une première évaluation de la croissance des deux souches Bta et Btk dans les boues, ont permis de constater que plusieurs facteurs peuvent influencer la croissance et la sporulation de Bt : le milieu de culture et ces caractéristiques ainsi que les conditions de fermentation. Ce qui a amené à étudier l'effet de certains paramètres jugés pertinents, sur la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine.

# 5.2.2 Effet de la concentration des solides totaux (ST) des boues mixtes de la CUQ sur la croissance de *Bta* et *Btk*

La comparaison de la croissance de Bt dans des boues de la CUQ dont la concentration des solides totaux (ST) est respectivement de 46 d/l et 26g/l a permis de constater qu'une forte concentration de ces derniers (46 g/l) permet d'obtenir une faible prolifération de Bt par rapport à

des boues dont la concentration des ST est de 26 g/l. Le potentiel entomotoxique diminue lorsque la concentration des ST passe de 26 g/l à 46 g/l. Ceci peut être expliqué par le fait qu'une forte concentration des ST implique une forte viscosité du milieu et donc un faible transfert d'oxygène. Pour remédier à ce problème, il faut une forte aération et/ou une forte agitation. Des études de Sachdeva et al. (2000) ont observé une diminution du potentiel entomotoxique lorsque la concentration des solides totaux est passée de 25 à 40 g/litres. Le faible nombre de cellules et de spores et le faible potentiel entomotoxique obtenu dans le cas de 46 g/l peuvent être expliqués par plusieurs facteurs incluant la concentration de O2 dans le milieu et l'inhibition due à la forte concentration des solides totaux (Lachhab et al., 2001).

La relation entre la croissance, la sporulation et la production de toxine ont fait l'objet de plusieurs études. Ces dernières ont montré que la sporulation ainsi que la synthèse de la toxine sont fortement reliées à l'apport en oxygène (Avignone-Rossa et al., 1992; Pearson, et Ward 1988; Dulmage, 1981). Le suivi de l'évolution de O2 dans les boues avec une siccité de 46 g/l a permis de monter que la concentration de O2 a atteint des valeurs inférieures à 1 ppm. Il faut noter que la concentration de O2 dans les boues au début de la fermentation avant l'inoculation par Bt était de l'ordre de 5 ppm. Cela peut être dû à un faible transfert de O2 de la phase gazeuse à la phase liquide, les facteurs qui peuvent influencer le transfert de l'oxygène dans un milieu liquide sont : la température, le degré de turbulence, les caractéristiques du milieu à savoir la viscosité, la concentration des solides totaux. Dans le cas des boues avec ST= 46g/l la concentration des spores et le potentiel entomotoxique étaient faibles. Dans le cas d'une limitation en O2, des concentrations de toxine ainsi que la sporulation étaient nettement inférieures à celles obtenues dans le cas d'une production non limitée en oxygène (Avignone-Rossa et al., 1992; Pearson et Ward, 1988). De plus, le rendement de la toxine peut diminuer suite à une réduction de l'oxygène dans le milieu, ce qui peut affecter le mécanisme de synthèse de la toxine. En effet, la concentration de l'oxygène dissout, au cours de la fermentation du substrat liquide, est en étroite relation avec le taux de respiration des cellules (Moraes et al., 1980) et la synthèse de  $\delta$ -endotoxin par Bt (Avignone-Rossa et al., 1992).

Il semble, par contre, que les boues dont la concentration des solides totaux est de 26 g/l permettent une meilleure mobilité des bactéries. Ceci est dû à la faible viscosité du milieu et à une meilleure aération du milieu qui permettent un meilleur transfert de masse.

Il est également important de noter que l'insuffisance d'un élément nutritif ou son excès peut influencer la production de Bt (cas de ST= 10 g/l). Des études de Pearson et Ward (1988) utilisant différentes sources de carbone (du glucose, des mélasses et de l'amidon) et différentes concentrations, ont montré que les niveaux d'entomotoxicité varient dans les complexes spores-cristaux produits par Bti. Une forte concentration de carbone dans le milieu de culture peut réduire le potentiel entomotoxique du bacille. Des résultats obtenus, en travaillant avec la variété galleriae dans un milieu contenant du glucose, ont montré que des concentrations de ce sucre supérieures à 50 g/l ont un effet négatif sur la croissance et la sporulation de la bactérie (Sakharova et al., 1989). Il est donc très important de trouver la concentration optimale des sources de carbone de façon à éviter des conditions pouvant inhiber la croissance de la bactérie (Scherrer et al., 1973). Une concentration des solides totaux de 26 g/l dans les boues de la CUQ, peut donc être l'optimum nécessaire en matière d'éléments nutritifs qui permet d'obtenir une meilleure efficacité de Bt.

L'optimisation des solides totaux dans le milieu de culture, à savoir les boues, a donc permis, non seulement d'améliorer le transfert et la concentration de O2 dans le milieu, mais également d'optimiser la disponibilité des éléments nutritifs comme le carbone et l'azote. Ce qui peut permettre de réduire les coûts reliés à l'aération lors de production de Bt. L'aération est, en effet, l'un des facteurs les plus importants qui affectent le coût global du procédé de la production de Bt.

#### 5.2.3 Effet du type de boues sur la croissance de Bta et Btk

Plusieurs études ont permis de monter l'impact, entre autre, de la composition du milieu de cultures sur l'entomotoxicité du complexe spores cristaux produit par Bt (Avignone-Rossa et Mignone, 1993; Yudina et al., 1993; kuppusamy et balaraman, 1991; Moraes et al., 1980). Une entomotoxicité élevée nécessite une croissance et une sporulation élevées (Kang et al., 1992).

Selon certains auteurs (Dulmage, 1970b) la production de la δ-endotoxine par Bt doit être considérée principalement comme un problème de fermentation étant donné que le niveau entomotoxique des cristaux produits par Bt dépend des conditions de fermentation et de la souche (milieu de culture, pH, température, aération). Il est donc important d'envisager la possibilité de l'existence de boues d'épuration qui, sous des conditions de fermentation bien spécifiques, pourraient être plus appropriées que d'autres.

L'utilisation de différents substrats pour la culture de Bt peut avoir un impact sur la croissance et la sporulation ainsi que sur la production d'endotoxine. Leur contenu en azote, carbone, glucides, protéines peuvent agir sur la formation de spores (Pearson et Ward, 1988; Debabov, 1982). Des études de A. O. Ejiofor (1991) ont montré que la culture de Bt dans un milieu composé de l'infusion de levure usée de brasserie et de sous-produits de manioc d'une usine de garri, donne de très bons résultats. La concentration des cellules a atteint 4.4x 1010 UFC/ml, le pourcentage de sporulation était de 95% avec un LC50 de 12 et 14.8 ppm.

### 5.2.3.1 Boues primaires et secondaires de Valcartier

La comparaison du nombre de cellules et de spores des deux souches Bta et Btk cultivées dans deux types de substrats, à savoir, des boues primaires et secondaires de Valcartier, montre que les boues secondaires permettent d'obtenir une meilleure croissance des cellules et des spores de Bt par rapport aux boues primaires ainsi qu'une entomotoxicité plus élevée. Cela peut s'expliquer par la nature du milieu de culture. Ces résultats confirment que la production de spores et d'endotoxine varie de façon significative en fonction de l'origine des boues et du processus de traitement des eaux usées (Tirado-Montriel, 2001). Les boues primaires sont produites dans le décanteur primaire et sont généralement plus chargées de solides en suspension d'origine minérale que les boues secondaires. Les boues secondaires sont produites dans le bassin d'aération et dans le clarificateur secondaire. Elles sont donc constituées d'un conglomérat de micro-organismes vivants ou morts, de débris de cellules microbiennes lysées, de particules organiques plus ou moins facilement biodégradables et de colloïdes organiques piégés dans le floc bactérien (Roques, 1979). Les boues secondaires offrent également à Bt un substrat riche en acides nucléiques, en glycogène, en enzymes solubles et en certaines protéines libérées après la lyse bactérienne et qui sont facilement biodégradables.

De plus, dans les boues secondaires de Valcartier la concentration des ST est de 25.4 g/l et le rapport C/N est de 6.96 (voir caractéristiques physico-chimiques en annexe I, Tableau 8.4). Cependant, le rapport C/N des boues primaires de Valcartier est plus faible; il est de 3.49 et la concentration des ST est de 20.3 g/l (voir caractéristiques physico-chimiques en annexe1). Ce qui peut expliquer en partie les faibles entomotoxicités trouvées dans ce dernier cas. Ceci tend à confirmer les études de Vidyarthi et al. (2001) montrant l'impact du rapport C/N sur la

production de spores et d'endotoxine. Un rapport optimal de 9.9 a été trouvé dans le cas des boues mixtes et de 7.7 dans le cas des boues secondaires.

#### 5.2.3.2 Boues de levure, boues d'amidon et boues de la CUQ

La variation des sources de carbones et de leurs concentrations dans le milieu de culture peut avoir un effet sur la production de la  $\delta$ -endotoxine de Bt (Pearson et Ward, 1988). Les boues d'amidon permettent non seulement d'obtenir des concentrations des cellules et des spores plus élevées, mais également un meilleur potentiel entomotoxique. En effet, les boues d'amidon sont une source de carbone facilement assimilable par les cellules bactériennes. De même, il importe de noter que, les boues mixtes de la CUQ ont une concentration des ST de 40 g/l et le rapport C/N est de 10.08 et qui ont été diluées pour obtenir une concentration de ST de 25 g/l. Par ailleurs, les boues d'amidon qui sont une source de carbone facilement assimilable par Bt, ont un rapport C/N est plus élevé. Il est de 16.20 et la concentration de ST est de 26.3 g/l. De plus, au cours de la fermentation le pH de l'amidon varie entre 6.0 et 7.89. Il importe de signaler que la sporulation est inhibée pour des pH inférieurs à 5.5 (Salama et al., 1983). Le rapport C/N peut également avoir des effets sur la production de Bt il est dans le cas des boues d'amidon de 16.2, alors qu'il est plus faible dans le cas des levures (C/N = 6.17). En effet la production de spores et d'endotoxine varie de façon significative en fonction de l'origine des boues et du processus de traitement des eaux usées dont elles sont l'origine (Tirado-Montriel, 1998 et 2001). De même des études de Vidyarthi et al. (2001) ont permis de montrer l'effet du rapport C/N sur la production de spores et d'endotoxine.

En somme, ces résultats indiquent que la fermentation de Bta et Btk dans les boues de la CUQ et l'amidon promet un biopesticide potentiel, en comparaison avec d'autres résultats obtenus pour d'autres milieux de culture de Bt (Dulmage, 1981; Obeta et Okafor, 1984; Okafor, 1987). Les boues de la CUQ restent également très concurrentielles.

La stabilité et la reproductibilité des boues des stations de traitement des eaux usées sont des conditions fondamentales pour une production commerciale de Bt. La culture de Bt dans différents échantillons de boues et l'analyse des résultats obtenus permettent de constater qu'il n'y a pas de différence importante entre les différents potentiels entomotoxiques, la variabilité de ce dernier reste inférieure à 3%. Les résultats de cette partie de la recherche s'avèrent d'une grande importance étant donné qu'ils démontrent une grande stabilité du potentiel entomotoxique

de Bt, après un passage dans un milieu de culture alternatif si complexe telles que les boues d'épuration.

### 5.2.3.3 Variation du pH

Au début de la fermentation le pH descend jusqu'à des valeurs d'environ 4 dans le cas du milieu soya et atteint des valeurs de 6.26 dans le cas des boues de la CUQ et de 6.04 dans le cas des boues d'amidon. Ceci peut être expliqué dans le cas du milieu soya par la production d'acide acétique suite à l'assimilation du glucose (Xiao-Ming et al., 1998). Le pH remonte ensuite à environ 8, l'utilisation de substances riches en azote libèrent des amines ayant contribué à l'augmentation du pH (Rowe et Margaritis, 1987). Le pH des boues de la CUQ ainsi que celui de l'amidon varie entre 6 et 8. En milieu synthétique, le pH atteint des valeurs de l'ordre de 4, la sporulation pourrait être inhibée dans ces conditions. En effet, Salama et al. (1983) a montré l'effet d'un faible pH sur la sporulation des bactéries. Il faut également rappeler que l'assimilation des acides aminés et des protéines libère l'ion ammonium (Fisher, 1993), ceci maintenait le pH presque toujours alcalin dans le cas des boues.

En somme le pH peut avoir un impact sur la croissance et la sporulation et donc peut expliquer les meilleurs résultats obtenus dans le cas des boues de la CUQ et des boues d'amidon. En effet, les valeurs optimales du pH pour la croissance et la sporulation sont proches de la neutralité. Des études de l'effet du pH sur la sporulation de Bt montrent que la sporulation est réduite à pH supérieur à 7.6 (Halvorson, 1975), et diminue de façon très importante dans le cas d'un pH 6 (Morris et al., 1996).

### 5.2.3.4 Croissance des deux souches (*Btk* et *Bta*) dans des mélanges de différents types de boues : CUQML, CUQMAL, CUQMAL, CUQM

Le fait de procéder à des mélanges des différents types de boues permet de faire varier les sources de carbones et d'azotes. Comme je l'ai déjà mentionné, des études de Pearson et Ward (1988) ont permis de montrer l'impact de la variation de sources de carbones sur la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine de Bt. De même Sakharova et al. (1989) en travaillant avec la variété galleriae dans un milieu de culture contenant du glucose, ont montré que des concentrations supérieures à 50 g/l ont un effet négatif sur la croissance et la sporulation de Bt.

Dans cette étude, les boues de la CUQ avec un ajout d'amidon et de levure permettent d'obtenir les meilleures concentrations de cellules et de spores pour les deux souches étudiées (Bta et Btk). Ce milieu présente deux sources de carbone, la matière organique et l'amidon qui peut être assimilée par les cellules bactériennes de Bt et deux sources d'azote qui proviennent des boues de la CUQ et les boues de levure. On obtient ainsi un milieu favorable à une bonne croissance de Bt. En effet, tout milieu de croissance de souches hétérotrophe doit posséder une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux (Stanier et al., 1966).

Notons également qu'en travaillant avec des mélanges de différents types de boues, les caractéristiques physico-chimiques du milieu de culture ont été modifiées. Les boues utilisées sont les boues mixtes de la CUQ dont la concentration des ST est de 40 g/l et le rapport C/N est de 10.08 et qui ont été diluées pour obtenir une siccité de 25 g/l (caractéristiques physico-chimiques en annexe I, Tableau 8.2 (échantillonnage du 14/07/99)). Cependant, les boues utilisées pour le mélange avec l'amidon ou la levure n'ont pas été diluées. Le mélange de boues de la CUQ+levure+d'amidon (CUQMAL) a une concentration de ST de 27 g/l, elle est de 27.5 dans le cas des boues de la CUQ+levure (CUQML) et les boues de la CUQ+amidon (CUQMA) ont une concentration de ST de 34 g/l.

Le rapport C/N du milieu CUQMAL est de 13.20, il est également de 10 dans le cas des boues CUQM+Amidon; alors qu'il est plus faible dans le cas du substrat CUQML (C/N= 8). Cela peut expliquer les différences entre les différents résultats trouvés. En effet, des études de Vidyarthi et al. (2001) ont montré que le rapport C/N avait un impact sur la production de spores et d'endotoxine. Un optimum de 9.9 a été trouvé dans le cas des boues mixtes et de 7.7 dans le cas des boues secondaires.

# 5.2.4 Croissance de *Btk* et *Bta* dans les boues mixtes de la CUQ avec différents types de traitements : acide, alcalin et avec des enzymes

L'hydrolyse des boues par des procédés utilisant un acide ou une base permet de rendre les éléments nutritifs plus disponibles et facilite leur assimilation. Tyagi et al. (1993) ont constaté qu'en conditions acides, l'oxydation du soufre en acide sulfurique conduit en partie à l'hydrolyse et à la minéralisation partielle des boues, les rendant ainsi facilement transformables par les bactéries. L'hydrolyse des boues par l'acide permet donc d'obtenir une meilleure concentration de cellules et de spores. Black et Snyman (1991) soulignent que les sources de carbone contenues

dans le milieu de culture peuvent influencer la production de cristaux. Cependant, c'est dans le cas de l'hydrolyse des boues par des enzymes qu'on a obtenu une meilleure entomotoxicité; cela pourrait s'expliquer par l'accumulation de résidus acides ou alcalins et qui peuvent inhiber la sporulation. En effet, d'après Stanier et al. (1966), les molécules non dissociées des substances acides et basiques peuvent pénétrer dans une cellule beaucoup plus facilement que les ions correspondants. À des pH relativement bas, les acides faibles qui sont alors dans une très large mesure sous forme non dissociés, peuvent pénétrer dans la cellule et l'altérer en modifiant son pH interne, tandis que les acides forts, en bonne partie dissociés, ne le peuvent pas. L'utilisation d'enzymes permet alors d'hydrolyser la matière organique sans laisser dans le milieu, de résidus qui peuvent avoir des impacts négatifs sur la croissance bactérienne.

#### 5.2.5 Influence d'ajout de source additionnelle d'extrait de levure sur la croissance de Bt

Plusieurs milieux ont été utilisés pour la production de Bt, or la majorité de ces milieux exigent l'ajout de certains nutriments comme l'extrait de levure (EL), du glucose, etc. (Ejifior, 1991; Mummigatti et Raghunathan, 1990) afin d'améliorer la croissance et la sporulation; ce qui entraîne généralement une augmentation des coûts de production de Bt (Salama et al., 1983 a, b, c). Des études de Tirado-Montiel (1997) ont mis en évidence que l'ajout d'extrait de levure dans les boues pour la production de Bt permettent d'améliorer la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine.

L'addition d'extrait de levure (EL) comme une source complémentaire d'azote, de minéraux, de vitamines, dans les boues de la CUQ, a permis d'améliorer le potentiel entomotoxique de Bt. La croissance et la sporulation ont augmenté au fur et à mesure que la concentration d'EL augmente. Des études de Bernhard et Utz (1995) ont montré que l'ajout d'EL contribue à améliorer la sporulation et la production de la δ-endotoxine par Bt; ceci est probablement lié à la présence d'éléments essentiels qui favorisent la croissance et la sporulation et par le fait même la production de la δ-endotoxine. Comme signalé précédemment, kang et al. (1992) et de Pearson et Ward (1988) indiquent que pour obtenir un potentiel entomotoxique élevé une bonne croissance et une bonne sporulation de Bt sont nécessaires. Par ailleurs, Il faut signaler que l'EL est un produit cher, son utilisation à des quantités élevées augmenterait le coût de production de Bt.

### 5.2.6 Évolution de l'entomotoxicité de Bt en fonction du temps

L'entomotoxicité suit une tendance polynomiale. Le potentiel entomotoxique a commencé à se manifester au début de la fermentation de Bt dans les boues de la CUQ. Les résultats des expériences réalisées par Kanda (1987) avec Bt variété kurstaki HD-1 ont montré que les gènes qui codent pour l'entomotoxicité chez cette bactérie s'expriment non seulement pendant la phase de sporulation mais peuvent aussi s'exprimer pendant la phase de croissance exponentielle de la bactérie.

Le potentiel entomotoxique est faible au début de la fermentation; ce qui est en conformité avec le nombre de cellules et de spores relativement plus faible. De plus, au début de la fermentation de Bt, le processus de la sporulation et de la production du cristal protéinique ne s'est pas encore entamé. Au bout de 40 h de fermentation, l'entomotoxicité atteint son maximum, elle diminue ensuite légèrement vers la fin de la fermentation (après 48h de fermentation). Cette diminution peut être expliquée par les variations que subi le pH au cours de la fermentation, ce dernier atteint des valeurs supérieures à 8 affectant ainsi la croissance bactérienne, la sporulation et la production d'endotoxines. Cette observation a été confirmée par les études de Faust et Bulla (1982) qui ont montré que le pH final du milieu de culture peut affecter l'accumulation de toxines. De même, Huber et al. (1987), Affirment que des pH extrêmes brisent la structure des protéines affectant ainsi l'activité insecticide du bacille.

Donc, afin de réduire le temps de fermentation et par le fait même le coût de production de Bt dans les boues, il faut arrêter la fermentation quand l'entomotoxicité atteint son niveau maximum, qui est dans notre cas entre 40h et 48h.

### 5.3 Étude de l'effet de l'inoculum sur la production de B. thuringiensis

### 5.3.1 Effet du milieu de préparation de l'inoculum sur la production de Bta et Btk

L'inoculum est un paramètre clé dans la culture de souches microbiennes comme Bt, il peut influencer la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine (Sachdeva et al., 2000). La préparation de l'inoculum et la production de Bt dans le même milieu de culture (boues de la CUQ) permettent d'améliorer le taux de croissance et la sporulation de ces deux souches. La sporulation dans le cas de l'utilisation des boues mixtes de la CUQ comme substrat de la préculture commence plutôt que dans le cas de l'utilisation de la TSB (Lachhab et al., 2001). En effet, cette technique permet aux bactéries de s'acclimater, d'entrer plus rapidement dans la phase de croissance, donne ainsi des souches beaucoup plus performantes dans les boues. Chez tout organisme, un certain équipement enzymatique est nécessaire à leur croissance et au maintien de leur métabolisme. Cependant, de nombreuses enzymes ne sont synthétisées qu'en réponse à la présence de composés spécifiques appelés inducteurs, qui se trouvent dans le milieu de culture. La composition enzymatique d'une cellule microbienne n'est donc pas constante; elle varie continuellement en réponse aux modifications du milieu extérieur. Ainsi, la présence de nouvelles substances dans le substrat de fermentation tend à augmenter la phase de latence. Il est également nécessaire de noter l'importance de la paroi des cellules pour le passage des nutriments, ce dernier se faisant par des sites de combinaison spécifiques, situés dans la membrane, qui effectuent le transfert sélectif de certains composés et certains ions, ce qui nécessite une certaine adaptation de la cellule au nouveau milieu.

L'utilisation du TSB comme milieu de préculture montre une phase de latence plus longue lors du transfert du Bt entre les deux milieux de cultures à savoir TSB/Boues de la CUQ. Ce qui réduit l'efficacité et la performance. Le problème causé par une phase de latence plus longue peut être dû à l'inoculum, tel que rapporté dans la littérature. D'après Hockenhull (1980), le milieu de préparation de l'inoculum doit faciliter la transition vers le milieu de production finale. L'interaction entre le milieu de préculture et le milieu de culture finale est cruciale dans le développement de l'inoculum. En règle générale, le transfert devrait être fait entre des milieux similaires ou identiques. Selon Calam (1976) la performance d'un inoculum est jugée par son efficacité à accomplir sa tache finale, particulièrement sa reproductibilité, dans des conditions bien spécifiques.

#### 5.3.2 Effet du pourcentage d'inoculum utilisé initialement pour la fermentation de Bt

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production de Bt dans les boues, entre autre l'inoculum (Sachdeva al., 1999). L'étude de l'effet du pourcentage de l'inoculum utilisé initialement sur la production des cellules et des spores, ainsi que l'entomotoxicité a permis de constater, d'une part, qu'un faible pourcentage entraîne généralement une faible prolifération de Bt et une faible entomotoxicité. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un faible nombre de cellules viables dans le cas de 1% entraı̂ne une réduction de la prolifération de Bt. D'autre part, de fortes concentrations des cellules (4% et 5%) initiales dans le milieu peuvent entraîner une forte consommation de l'oxygène et des éléments nutritifs en phase de croissance exponentielle et en phase de sporulation. Ces nutriments sont particulièrement nécessaires à la sporulation et à la formation de δ-endotoxine; ce qui peut constituer un facteur limitant la croissance. En effet, lorsque la matière organique biodégradable est consommée par une masse de microorganismes, en milieu aérobie, il y a consommation d'oxygène par ces microorganismes pour leurs besoins énergétiques, leur reproduction par division cellulaire (synthèse de la matière vivante) et leur respiration endogène. De plus, dans le cas des bactéries sporulantes, il a été démontré que la synthèse de la toxine est fortement reliée à l'apport en oxygène (Avignone-Rossa et al., 1992; Pearson et al., 1988). Sachdeva et al. ont pu aboutir aux mêmes conclusions en utilisant des pourcentages d'inoculum de 1% et 5% pour produire Bt dans des boues de Jonquière (Québec, Canada) hydrolysées ou non avec de l'acide. Le potentiel entomotoxique obtenu dans ce cas est de 6364 UI/µl pour 1% et 5363 UI/µl dans le cas de 5%.

Dans cette optique, pour obtenir le meilleur rendement dans la production de Bt par fermentation dans les boues, les expériences ont démontré que le pourcentage optimum de l'inoculum initial est de 2%. Ce taux de 2% permet non seulement d'améliorer la croissance des cellules et des spores mais également d'obtenir un meilleur potentiel entomotoxique.

# 5.4 Effets de la double inoculation sur la production de B. thuringiensis

Comme il a été déjà mentionné, plusieurs travaux ont été réalisés afin d'améliorer l'efficacité de l'insecticide biologique Bt et le rendre aussi concurrentiel que les pesticides chimiques. Ces travaux visent en particulier: le développement de nouvelles techniques, l'amélioration des conditions de fermentation notamment l'aération qui augmente le prix de production, l'amélioration des moyens de récolte du produit final, l'isolation de nouvelles souches de Bt beaucoup plus productives et plus toxiques, l'utilisation de nouveau substrat de culture moins chère que ceux du milieu synthétique, l'amélioration de la performance de l'inoculum (Calam, 1976; Hockenhull, 1980), etc. L'inoculum qui est donc un facteur clé dans la production de Bt peut aussi participer à la réduction des coûts de production qui sont jusqu'à présent très élevés. L'utilisation d'une forte concentration des cellules comme inoculant initial s'est avérée inefficace (Lachhab et al., 2001). D'après Halvrson (1957), une faible oxygénation réduit le pourcentage de sporulation. De même, des études de Entwistle et al. (1993) montrent que la croissance de Bt devient lente sous des conditions d'anaérobies et sa sporulation peut se voir inhibée. L'utilisation de la double inoculation, une nouvelle méthode développée au cours de ce travail, a montré son efficacité dont l'amélioration du nombre de cellules et de spores et de l'entomotoxicité de Bt dans les boues. Cependant, cette dernière reste relativement faible par rapport au nombre de cellules et de spores obtenu. Ces résultats corroborent le fait déjà mentionné dans la littérature, qu'il n'est pas possible de prédire le potentiel du complexe spores-cristaux à partir du compte de spores, car des milieux de culture de compositions différentes ont une influence sur l'entomotoxicité des cristaux (Dulmage, 1970; Abdel-Hameed et al., 1990). Seuls les bioessais permettent d'estimer le potentiel entomotoxique. Dulmage et al. (1971) confirment également ces observations. Selon eux, il y a absence de relations directes entre l'entomotoxicité et le nombre de spores ou la quantité d'endotoxine produite. L'amélioration de cette technique ainsi que l'optimisation de différents paramètres pouvant l'influencer, pourraient donc entraîner une augmentation du potentiel entomotoxique et une utilisation rationnelle de l'aération et du substrat qui représente environ 35 et 59 % du coût total (The Bacillus thuringiensis Production Handbook, 1993).

Plusieurs facteurs entrent en jeu pour la réalisation de la double inoculation. D'une part, la nature physiologique de Bt elle-même : la formation d'endospore confère un grand pouvoir de survie et de résistance aux bactéries sporulantes (Stanier et al., 1966). Une fois que la phase de

sporulation est atteinte un deuxième inoculant peut être utilisé. D'autre part, les boues sont très riches en éléments nutritifs, dont les plus complexes peuvent être hydrolysés par les enzymes produites par les cellules bactériennes de Bt au cours de la première phase de la fermentation et qui seront utilisées par le second inoculant. Finalement la phase de sporulation permet de libérer, entre autres, des acides nucléiques, des enzymes solubles et des protéines intracellulaires facilement biodégradables et qui peuvent être remétabolisées très rapidement par un deuxième inoculant : les enzymes solubles, les acides nucléiques et les produits de stockage d'énergie comme le glycogène et certaines protéines. Le rapport des constituants cellulaires varie avec le stade de croissance de celle-ci. Ils sont constitués d'approximativement 30% des protéines, 40% de carbohydrates et de 30% de lipides (Roques, 1979).

En somme, la réalisation de la double inoculation a permis de montrer son efficacité en ce qui concerne le nombre de cellules et de spores de Bt cultivée dans les boues des stations de traitements des eaux usées et dans les boues d'amidon. Une double inoculation de 1% donne de meilleurs résultats qu'une seule inoculation de 2%. L'étude de la variance, lors de l'analyse statistique de ces deux méthodes d'inoculation, permet de constater une différence significative entre les résultats du nombre de cellules et de l'entomotoxicité de ces deux techniques.

## 5.4.1 Étude d'une deuxième inoculation dans le surnageant.

Après une première fermentation de 24 h, le surnageant des boues et celui du milieu synthétique récupéré supportent bien la croissance de Bt. Cela montre 1) que les deux milieux supportent bien la croissance de Bt après une première fermentation de 24 et 2) la présence dans le surnageant d'éléments nutritifs essentiels pour la croissance et la sporulation du deuxième inoculant. Cependant, le rendement dans la production de cellules et de spores a été plus faible dans le surnageant que dans le cas des boues. Cela peut s'expliquer dans ce dernier cas par le fait qu'une présence de matière organique contenue dans les solides de boues encore utilisables par Bt ne se trouve pas dans le surnageant. Donc, il est probable que cette différence ait influencé le rendement dans la production de cellules, du complexe spores-cristaux et par le fait même le potentiel entomotoxique des surnageants qui sont plus faibles par rapport à ceux obtenus dans les boues. Des études de Tirado-Montiel (1997) ont permis également de faire les mêmes observations.

Le nombre de cellules et le potentiel entomotoxique de Bt ont été plus élevés dans le cas de l'utilisation du surnageant des boues de la CUQ comme substrat de culture de Bt en comparaison avec celui du milieu synthétique. Cela peut être expliqué en partie par le fait que les boues sont riches en éléments nutritifs complexes qui sont non disponibles dans un premier temps et qui peuvent être hydrolysés au cours de la première phase de la fermentation ; ce qui les rend plus disponibles pour une nouvelle suspension bactérienne. Alors que le milieu synthétique est riche en éléments nutritifs facilement assimilables par les bactéries du premier inoculant entraînant ainsi l'épuisement de certains éléments nutritifs dans le milieu de culture qui sont essentiels à la croissance et la sporulation de Bt; ce qui rend la deuxième inoculation moins performante dans ce dernier substrat que dans le cas des boues. Le choix du substrat pour la réalisation de la double inoculation est donc important et décisif.

# 5.4.2 Effet de différents pourcentages d'inoculum dans le cas de la double inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de *Btk*

La production de la  $\delta$ -endotoxine qui constitue l'élément fondamental des cristaux produits par Bt, a lieu pendant la phase de sporulation de ce bacille. Donc il est très important d'avoir une bonne croissance de la bactérie et un bon niveau de sporulation dans les boues (Tirado-Montiel, 1997). Plusieurs facteurs peuvent influencer la croissance et la sporulation de Bt dans les boues, entre autres, l'inoculum (Sachdeva al., 1999). De plus, l'étude des effets du pourcentage de l'inoculum utilisé initialement, sur la production des cellules et des spores, montre que des concentrations des cellules (4% et 5%) initiales dans le milieu peuvent entraîner l'épuisement de l'un ou de plusieurs éléments nutritifs ou de l'oxygène dans le milieu nécessaire à la sporulation et à la formation de  $\delta$ -endotoxine (Lachhab et al, 2001). Il est donc important d'optimiser le pourcentage d'inoculum dans le cas de la double inoculation.

La comparaison de la croissance des cellules et des spores de Bt dans les boues mixtes de la CUQ dans le cas de la double inoculation, permet de constater qu'un inoculant d'environ 1% donne de meilleurs résultats qu'un inoculant de 2% ou 3%. Cette différence peut être expliquée par l'épuisement dans le milieu de culture d'éléments nutritifs ou encore d'oxygène. Selon Halvrson (1957), la sporulation peut être affectée par l'épuisement d'O2 dans le milieu. Comme je l'ai déjà mentionné, les études de Entwistle et al. (1993) ont révélé que la croissance de Bt devient lente sous des conditions d'anaérobies et sa sporulation peut se voir inhibée.

#### 5.4.3 Effet du temps de la réalisation de la deuxième inoculation sur la croissance de Btk

Le coût de production dépend, entre autres, des coûts du milieu de culture et des conditions de fermentation utilisées (Ejiofor, 1991). Ces deux facteurs ont un impact non seulement sur le potentiel entomotoxique de Bt mais également sur le temps de fermentation. Des études de Black et Snyman (1991) ont monté que le temps pour atteindre la phase stationnaire et la production du complexe spores-cristaux peuvent être influencés par la disponibilité des sources de carbone. Il serait donc important de déterminer le temps opportun pour réaliser la deuxième inoculation.

Le temps optimum de la deuxième inoculation étant de 15h afin de permettre d'améliorer la croissance et la sporulation de Bt et de rationaliser l'utilisation des éléments nutritifs ainsi que d'oxygène. De plus, l'utilisation de la deuxième inoculation à un temps plus élevé exigera certainement une prolongation de la durée de fermentation pour une meilleure sporulation; ce qui peut être, en soi, un facteur limitant de la production de Bt. Il important de noter que la deuxième inoculation ne doit pas être faite au cours de la croissance exponentielle ou pendant la phase de sporulation, cette dernière exige une forte concentration de O2 dans le milieu (Sachdeva et al., 2000). Nous évitons ainsi d'influencer la productivité du premier inoculant et par le fait même le potentiel entomotoxique de Bt. En effet, d'après Stanier et al. (1966), l'oxygène est un nutriment essentiel des bactéries aérobies strictes. Il joue un rôle important dans les procédés de fermentation.

#### 5.4.4 Effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la double inoculation

Il est ressorti dans la littérature que dans les boues hydrolysées la matière organique se présente sous une forme soluble qui est facilement assimilable par les micro-organismes. En comparant différents types de boues hydrolysées ou non, Tirado-Montiel (1997) a montré que le traitement des boues permet d'améliorer le potentiel entomotoxique de Bt. L'étude de la croissance de Bt dans le cas de la deuxième inoculation dans les boues hydrolysées à l'aide de l'enzyme KamiZym-D permet de constater que le nombre de cellules et de spores est plus élevé dans le cas des boues avec traitement. Cependant, cette différence reste faible. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'une double inoculation n'est efficace que dans un milieu riche en matière organique sous forme solide pouvant être hydrolysée par le premier inoculant qui la rendra disponible et facilement utilisable par un deuxième inoculant.

#### 5.4.5 Effet de la concentration des ST dans les boues sur la double inoculation

Comme je l'ai déjà constaté dans cette étude et qui a fait l'objet d'une publication (Lachhab et al., 2001), la concentration des solides a un impact sur le potentiel entomotoxique. Des études de Sachdeva et al. (2000) ont également montré que le potentiel entomotoxique diminue lorsque la concentration de ST a passé de 25 à 40 g/litre. Le faible nombre de cellules et de spores et le faible potentiel entomotoxique, obtenus dans les boues à forte concentration de ST, peuvent être dus d'une part, au faible transfert de O2 de la phase gazeuse à la phase liquide, et d'autre part, à la faible mobilité des bactéries. Ces deux facteurs sont particulièrement affectés par une forte concentration des ST et une forte viscosité des boues. Des études de Rossa et al. (1992) ont montré que l'endotoxine et la sporulation diminuent sous des conditions d'oxygénation limitées. Par ailleurs, des boues à forte concentration en ST sont riches en éléments nutritifs. Elles peuvent supporter la croissance et la sporulation de Bt. Il donc nécessaire de trouver l'optimum à ce paramètre dans le cas de la double inoculation.

Les résultats de cette partie montrent que les boues dont la concentration des ST est de 35 g/l permettent une meilleure croissance de Bt dans le cas de la double inoculation. Ceci peut être dû à une forte présence d'éléments nutritifs qui peuvent être utilisés par les bactéries des deux inoculants. Par ailleurs, une concentration de 45 g/l entraîne forcément une forte viscosité du milieu pouvant affecter le transfert de l'oxygène dans le milieu et la mobilité des bactéries.

# 5.5 Application de la double inoculation dans les bioréacteurs 15A, 15B en utilisant les boues secondaires de la CUQ comme substrat

Certes, le milieu de culture est un facteur qui affecte la croissance, la sporulation et la production du complexe spores-cristaux par Bt (Mummigati et Raghunatan, 1990; Obeta et Okafor, 1984). Cependant, le pH, la température, l'agitation peuvent avoir des effets sur ces derniers. Des études de Rowe et Margaritis (1987) ont montré que les températures optimales pour faire la fermentation de Bt correspondent à 30 °C et 32 °C. Le pH doit être contrôlé à 6.5 et 7.5 pendant la fermentation; ce qui permet l'obtention d'un potentiel entomotoxique plus élevé (Foda et al., 1985; Abdel-Hameed et al., 1991). De même, une diminution de l'agitation à des valeurs inférieures à 100 rpm permet d'obtenir un potentiel entomotoxique faible (Abdel-Hameed, 1991). Moraes et al. (1980) ont montré un effet inhibiteur d'une forte concentration d'oxygène sur le taux de respiration. Des études de Tirado-Montrel (1997) ont mis en relief un effet inhibiteur de la concentration d'oxygène au dessus d'un niveau optimum. L'utilisation de fermenteurs afin de contrôler ces paramètres permettrait d'améliorer le potentiel entomotoxique.

L'application finale de la double inoculation en utilisant les fermenteurs a permis de constater que cette dernière favorise l'accroissement des cellules et des spores de Bt. Les résultats de l'entomotoxicité montrent que la technique de la double inoculation a permis d'obtenir également un meilleur potentiel entomotoxique. L'utilisation de bioréacteurs conduit également à augmenter la concentration des ST du milieu de culture tout en conservant la même performance des cellules bactériennes. Il est donc important d'approfondir l'étude de cette technique en fermenteur en variant les différents paramètres qui peuvent interagir avec la réalisation de la double inoculation, cela dans le but d'améliorer l'entomotoxicité finale de Bt.

## 5.5.1 Étude de l'évolution de l'oxygène dans le cas de la double inoculation

L'oxygène joue un rôle important dans les procédés de fermentation. Un taux élevé d'aération est nécessaire pour maximiser la croissance de cellules, la sporulation et la production de δ-endotoxine par Bt (Foda et al., 1985; Sachdeva et al., 1999). La production de la δ-endotoxine par Bt a lieu pendant la phase de sporulation de cette bactérie. Cette dernière peut être affectée par une faible concentration de O2. Comme signalé précédemment, Avignone-Rossa et al. (1992) ont montré qu'une faible concentration d'oxygène dans le milieu affecte le mécanisme de synthèse de la δ-endotoxine. Dans le cas d'une carence d'oxygène dans le milieu, la croissance de Bt peut

devenir lente et la sporulation inhibée (Bernhard et Utz, 1993; Foda et al., 1985). Le suivi de la concentration de O2 montre que la concentration de O2 diminue au fur et à mesure que le nombre de cellules croît (Stanier et al., 1966). Cependant, cela présente une seconde diminution dans le cas de la deuxième inoculation. Cela peut être expliqué par la présence de deux phases de croissance exponentielle et par le fait que dans la deuxième phase le taux de croissance spécifique est plus faible par rapport à la première phase.

## 5.5.2 Évolution du pH dans le cas de la double inoculation

Si le pH est contrôlé entre 6.5 et 7.5 pendant la fermentation, la croissance, la sporulation et la production de la δ-endotoxine par Bt sont favorisées (Foda et al., 1985; Abdel-Hammed et al., 1991). Des études de Tirado Montiel (1997) ont montré que l'ajout de tampons, afin de maintenir le pH constant pendant la fermentation, a un effet bénéfique sur le pourcentage de sporulation et le niveau d'entomotoxicité du complexe spores-cristaux produit par Bt.

Dans cette étude, le pH diminue au début de la fermentation dans le cas des deux méthodes d'inoculation qui peut être expliquée par la production d'acide acétique suite à l'assimilation du glucose (Xiao-Ming et al., 1998). Après 15 h de fermentation on assiste à une autre diminution qui reste proche de 7 dans le cas de la deuxième inoculation. Cela peut être expliqué par l'activité métabolique du second inoculant. Il faut aussi rappeler que l'assimilation des acides aminés et des protéines libère l'ion ammonium (Fisher, 1993) qui maintient le pH presque alcalin. Le pH remonte ensuite à 8; Cela peut être expliqué par la consommation des acétates ou aussi l'utilisation de substances azotées comme source de carbone faisant libérer des amines qui augmentent le pH (Rowe et argaritis, 1987). Des études de Abdel-Hameed (1991) ont montré que le pH peut monter jusqu'à 8.7 pendant la sporulation suite à l'utilisation des acides pendant cette phase. Il faut noter que le pH peut jouer un rôle inhibiteur lorsqu'il chute sensiblement (Ejiofor et Okafor, 1989). Comme il a été déjà mentionné, Salama et al. (1983b) indiquent qu'un pH de 5.5 ou moins pourrait inhiber la croissance et la sporulation de Bt.

D'autres études de Benoit et al. et de Morris et al. ont montré qu'au début de la fermentation Bt tire son énergie de l'utilisation des glucides dégradés en pyruvate et en acides. Ce qui permet au pH de diminuer et d'atteindre dans certains cas des valeurs de 5. Le pH peut augmenter suite à la consommation des pyruvates, des acétates et des autres acides et atteindre des valeurs de 8.

# 5.5.3 Évolution des solides totaux (ST) dans les boues secondaires au cours de la fermentation de *Bt*.

Pour sa croissance Bt a besoin d'une source de carbone et d'azote qui peut être assimilé sous forme d'ammoniaque ou d'acide aminé (Ejiofor et Okafor, 1989). Pour son métabolisme, Bt utilise les boues qui sont riches en matière organique biodégradable (Tirado-Montiel, 1997). La transformation de la matière organique par les cellules bactériennes entraîne forcément une diminution de la concentration des solides totaux dans le milieu de culture.

Dans cette partie l'étude de l'évolution de la concentration des ST en fonction du temps, montre une diminution de cette dernière et ceci dans les deux cas (avec ou sans double inoculation). Cette diminution est, cependant, plus accentuée dans le cas de la deuxième inoculation. Cela peut être expliqué par une utilisation massive et plus importante de la matière organique biodégradable d'une part, par les cellules bactériennes du premier inoculant et d'autre part, par les cellules bactériennes du second inoculant.

#### 5.5.4 Évolution de la concentration du carbone dans le cas de la double inoculation

Bt a besoin pour sa croissance d'une source de carbone (Lisansky et al., 1993; Dulmage et Rhodes, 1971). Bien que les besoins physiologiques des variétés de Bt puissent varier (Dulmage et al., 1990), cette bactérie peut utiliser différentes sources de carbone. La concentration du carbone peut avoir des impacts sur le niveau entomotoxique du complexe spores-cristaux (Scherrer et al., 1973; Yudina et al., 1993). En effet, les bactéries métabolisent les hydrates de carbone pendant la phase végétative jusqu'à la formation des acides de carbone qui sont finalement oxydés en dioxyde de carbone (Freese et Fujita, 1976).

Dans le cas des boues, la biodégradation de la matière organique par les bactéries pour leur besoin métabolique réduit la quantité de carbone présent dans le milieu de culture. L'étude de l'évolution du carbone total montre que les deux courbes suivent une tendance plutôt linéaire. La courbe de tendance dans le cas de la deuxième inoculation a une pente plus faible que celle d'une seule inoculation. Cela peut être dû à une forte consommation du carbone dans le cas de deux inoculations, ce qui apporte une explication à la forte concentration des cellules produites lors de l'application de la deuxième inoculation.

# 5.5.5 Étude de l'activité protéolytique de Bt dans le cas de la double inoculation

Bt a la capacité de produire des amylases et des protéases (Bernhard et Utz, 1993). La production d'exoprotéases augmente au milieu de la phase logarithmique. Cet évènement a été reconnu comme étant relié avec le début de la sporulation (Avignone-Rossa et Mignone, 1995). Dans la présente étude j'ai constaté que l'activité protéolytique n'est pas stable, des pics à différentes périodes de temps sont observés; ceci a été également mentionné dans les travaux de Meunier, (1999). Comme le pH a été contrôlé dans les fermenteurs, ces pics peuvent être dus à une production non constante des protéases suite à l'assimilation des protéines. Une plus faible activité protéolytique dans le cas de deux inoculations a été également observée sur le milieu soya. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en milieu synthétique les cellules utilisent les sources de carbone qui sont facilement assimilables par les bactéries, la dégradation des protéines étant ainsi plus faible. Il importe de mentionner que cette partie doit faire l'objet d'une étude plus pousser afin de voir s'il existe une relation entre l'activité protéolytique et la production d'endotoxine.

# 6 RÉFLEXION GÉNÉRALE:

Au début de sa découverte, l'insecticide Bt n'a pas connu un essor important. Dès les années 30, en Europe et en particulier en France et en Europe de l'Est, les premières tentatives d'utilisation de Bt furent réalisées et servaient d'insecticide agricole particulièrement pour contrôler la pyrale du maïs ou la piéride du chou. Encore là, le produit n'étant pas au point, il était peu utilisé. Une première formulation commerciale, la "sporeine", aurait été produite en France vers 1938. Diverses tentatives de cet ordre sont restées sans suite, tant en Europe qu'aux États-Unis. C'est une meilleure connaissance de Bt qui marqua un tournant décisif dans la commercialisation de Bt à la fin des années 50, la recherche améliore la formulation du produit existant et amène la découverte de nouvelles souches; le Bt est alors devenu plus populaire (Otvos et Vanderveen, 1993). Grâce aux travaux de l'Institut Pasteur et de l'INRA, le premier produit commercial à base de Bt, la "Bactospéine", fut mis au point en 1959. Il est utilisé pour la lutte contre les Lépidoptères. Presque simultanément, en juin 1959, une société américaine déposait un procédé de fabrication pour un produit du même type, aujourd'hui commercialisé par la société Novartis sous le nom de "Thuricide". A partir des années 60 se sont développés aux États-Unis comme en Europe divers produits et formulations permettant d'élargir l'utilisation des

nouveaux larvicides, actifs contre les Lépidoptères et contre les Coléoptères. En 1989, les grandes compagnies internationales, comme les laboratoires Abbot (Le Dipel et le Foray 48B), Duphar (La Bactospeine), Sandoz (Thrucide), Mycogen (Mattch et MVPII) et Ecogen (Foil et Condor), avaient mis plus de cinquante produits différents à base de Bt. Tous ces produits ont largement été expérimentés en champ avant leur utilisation. Dans les années 90, des biopesticides de seconde génération modifiés génétiquement sont apparus sur le marché sous forme de bactéries recombinantes et de plantes transgéniques exprimant des toxines de Bt. La production mondiale actuelle, sans l'ex-URSS et de la république populaire de Chine, est de l'ordre de 2 à 3000 t/an. Suite à l'augmentation de l'utilisation de Bt dans le monde, cette production pourra rivaliser avec les productions industrielles des enzymes et des antibiotiques.

# 6.1 Les besoins en matière de biopesticides

Les biopesticides ont plusieurs avantages par rapport aux pesticides chimiques. Ils n'ont pas d'impact sur la santé et l'environnement. Le coût de développement et le délai de commercialisation des biopesticides sont moindres par rapport aux produits de synthèse. Selon Silvy et al (2001); le coût total de développement des biopisticides est de 1 et 10 millions de \$ sur une durée de 3 à 5 ans, contre 80 millions de \$ sur 8 à 10 ans. De même le coût d'utilisation des biopesticides a tendance à diminuer (Silvy et al., 2001); ce qui stimule l'intérêt des laboratoires partout dans le monde au développement de pesticides biologiques. Le développement et l'utilisation de biopesticides à grande échelle sont fortement souhaités pour le contrôle des insectes ravageurs des produits tant agricoles que forestiers ou des insectes vecteurs de maladies. Historiquement, l'utilisation de Bt s'est d'abord appliquée au domaine agricole, pour s'étendre ensuite aux problèmes de santé publique. Chaque année, plus de 30% de la production végétale mondiale : forêts, cultures maraîchères et industrielles, sont anéanties par les insectes phytophages. Les pertes des cultures causées par des parasites, des pathogènes et des mauvaises herbes sont estimées à 35% de la production agricole mondiale par année (Sanchis et al., 1996).

En Amérique du Nord, même si les cultures agricoles ne sont pas épargnées, c'est surtout le couvert forestier qui est sujet à la défoliation, ce qui engendre des conséquences économiques et écologiques considérables. Au Canada par exemple, les dégâts sont principalement provoqués par la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE), Choristoneura fumiferana (Lepidoptera: Tortricidae). Ce défoliateur est considéré comme l'insecte le plus ravageur des forêts de conifères

de l'Amérique du Nord (Smirnoff, 1983; Valéro, 1995), autant au point de vue de la superficie infestée et nombre d'arbres détruits qu'au point de vue de la fréquence et de la durée des épidémies (Smirnoff, 1983; Valéro, 1995). En 1975, plus de 72 millions d'hectares de forêts ont été défoliés par la tordeuse (Hardy et al., 1978). Au cours de la dernière épidémie au Québec, les pertes causées par cet insecte sont estimées à 135 millions de mètres cubes de bois en sapins et épinettes (Mercier, 1985). Ces ravages ont débouché sur une utilisation massive d'insecticides chimiques au cours des dernières décennies.

La lutte biologique contre les ravageurs forestiers offre donc une option de rechange attrayante aux multiples insecticides chimiques en Amérique du Nord. Des traitements de grande envergure, sur des milliers d'hectares, ont été menés à la fin des années 80 contre la tordeuse du bourgeon du pin, la tordeuse du bourgeon de l'épinette, etc. Dans les cultures maraîchères, les produits permettant de contrôler les Coléoptères s'avèrent très efficaces. Au Canada, 10% de la superficie modérément ou gravement défoliée qui est estimé à 300 millions d'acres de forêts pourraient profiter d'un traitement avec des biopesticides (Industries Canada, 1998).

Une tendance très importante et qui peut également augmenter la demande des biopesticides dans le marché mondial, est l'augmentation significative de la consommation des produits alimentaires biologiques développés avec moins de produits chimiques. De même le rejet des récoltes génétiquement modifiées du consommateur particulièrement en Europe, est une réaction qui a renforcé en 2000 le marché des biopesticides. Ceci retardera la pénétration dans le marché des graines génétiquement modifiées. De façon générale, les ventes des produits biologiques de protection de récolte augmentent, mais très lentement.

En somme, on peut constater en plus des avantages de l'utilisation des biopesticides, l'ouverture du marché donne une incitation éventuelle au développement de produits biologiques, d'où l'intérêt croissant que les investisseurs ont pour le bioinsecticide Bt.

# 6.2 Le Marché des biopesticides

La protection de nos cultures s'est toujours reposée sur les produits phytosanitaires qui représentent un marché de 26 milliards \$. Les insecticides chimiques représentent à eux seuls un marché de 8 milliards de \$. Les biopesticides ne représentent que 1.5% du marché soit environ 380 millions de \$, 90 % sont des bio-insecticides dont 90% sont à base de Bt. C'est dans le domaine agricole que l'utilisation des insecticides biologiques est la plus répandue: 60% du

marché contre 40% partagé entre la protection des forêts et la lutte contre les insectes vecteurs de maladies. Concernant ce dernier domaine de la lutte biologique, en termes de quantités de produit utile, les dérivés de Bti représentent environ 1000 tonnes annuelles sur un total de 50 000 tonnes d'insecticides chimiques (Industries Canada, 1998). En 1990, les ventes de biopesticides n'étaient que de 120 millions de \$, ce qui représentent un pourcentage inférieur à 0.5% du marché mondial. Aujourd'hui ces ventes continuent d'augmenter de 10 à 20% par ans (Sanchis et al., 1996).

La croissance du marché de biopesticides est intimement liée à la capacité des compagnies à développent des produits plus rentables; ce qui est très difficile. Ceci m'amène à relever et mettre l'accent sur les principaux facteurs qui peuvent influencer le marché des biopesticides et qui peuvent être regroupés en trois catégories : 1) la concurrence intense ; 2) l'introduction d'un certain nombre de nouvelles souches de Bt et de nouvelles formulations avec des prix de ventes sensiblement plus élevés ; 3) les variations des infestations de parasite selon les années qui causent des changements imprévisibles dans les volumes de ventes annuels.

Actuellement, la plupart des formulations à base de Bt sont produites par un nombre restreint de compagnies. En 1995, la compagnie Novatis domine avec 18.4% du marché, Koppert occupe le second rend avec 18.2% du marché et ensuite Abott Laboratoires avec 12.5%. Le marché global des biopesticides était de 200 millions de \$ en 1995, dont plus de 90% pour la lutte contre les insectes ; l'insecticide microbien Bt occupe la première place avec 100 millions de \$ (92%) (Silvy et al., 2001).

# 6.3 Technologie de production de Bt et enjeux

Même si l'efficacité des premiers insecticides à base de Bt était souvent imprévisible, les travaux de recherche et de développement visant à améliorer les formulations et les modes de distribution et d'application et à trouver de nouvelles souches plus actives ont progressé lentement. Ces dernières années on assiste à une avancée dans le domaine de la technologie de production de Bt. Ceci a conduit au développement de nouveaux produits plus efficaces et plus rentables. Cependant, il importe de signaler que le développement des biopesticides est limité par les caractères pratiques technologiques de livrer des produits rentables et efficaces avec une durée de conservation réaliste. Par ailleurs, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre au cours des dernières années afin d'accroître l'efficacité des biopesticides Bt :

- 1) en identifiant de nouvelles souches ayant une meilleure activité insecticide contre l'insecte cible : l'isolement de nouvelles souches puis l'établissement du spectre d'activité de ces différentes  $\delta$ -endotoxines sur plusieurs ravageurs ont permis de construire des souches dites améliorées;
- 2) en diversifiant ou en améliorant le mode d'administration de la toxine en utilisant les techniques offertes par la biotechnologie. Dans ce cas on cherche à faire exprimer les gènes cry codant pour la δ-endotoxines dans des hôtes divers;
- 3) en créant de nouvelles variétés végétales notamment par le transfert des gènes cry de Bt dans de nombreuses plantes (Sanchis et al., 1996).

Afin de répondre à ces critères et de développer un produit commercialement rentable et efficace, des travaux réalisés à l'INRS-ETE sont tournés vers la recherche et la mise au point de produits et d'innovations futures. Les membres du 'projet Bt' travaillent en étroite collaboration avec un certain nombre de sociétés et d'utilisateurs potentiels afin de faciliter la mise au point de produits améliorés. L'utilisation des boues comme substrats de culture permettrait de réduire les coûts de production. Le coût du milieu de culture qui représente généralement entre 35 et 40% du coût de production revient seulement au coût de son transport. Le développement de la méthode de la double inoculation réalisé au cours de ce travail constituerait une autre percée technologique en vue d'accroître l'efficacité des produits à base de Bt. Cette technique permettrait d'améliorer la croissance et le potentiel entomotoxique de Bt produit dans les boues.

Certes, le biopesticide Bt produit dans les boues des stations d'épuration des eaux usées peut être exploité à des fins commerciales, mais il faut tenir compte des différents facteurs signalées précédemment qui rentrent en jeu et qui influent sur le marché des biopesticides. Il faut également éviter certaines erreurs que la majorité des compagnies oeuvrant dans le domaine des biopesticides commettent dans leur approche de commercialisation. Une approche qui considère les biopesticides comme des produits faciles dont la production est rapide et qui reviennent moins chers. L'expérience démontre que la clef de la réussite aux affaires de biopesticides est le coût de production et c'est ce que j'ai visé réduire dans mes travaux de recherche à l'INRS-ETE.

En somme, la protection de l'environnement et le besoin de développer des produits plus sécuritaires font que les biopesticides ont un avenir dans le marché mondial. Les enjeux économiques de la production de biopesticides comprennent le coût de production, l'accès aux

marchés et la compétitivité avec les produits issus de la chimie de synthèse. L''extension de l'utilisation des insecticides biologiques passera avant tout par l'amélioration de leurs performances. La recherche doit viser à augmenter leur niveau d'activité, leur spectre d'action, à améliorer la qualité des formulations et leur persistance sur le terrain et surtout à réduire au minimum les risques de résistance pouvant être liée à leur utilisation. Les possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies permettent de développer différentes stratégies d'amélioration des bactéries entomopathogènes. À l'INRS-ETE par exemple, de nouvelles souches ont été isolées et de nouvelles techniques ont été développées. Le succès le plus remarquable des travaux réalisés à l'INRS-ETE dans le cadre du 'projet Bt' est la production de Bt dans un milieu disponible dont le prix revient seulement à celui de son transport et le développement de la double inoculation.

# CHAPITRE 7 CONCLUSIONS ET RECOMANDATIONS

#### 7 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

# 7.1 Effet du type de boues

L'utilisation de différents substrats pour la culture de Bt, à savoir, boues mixtes de la station d'épuration des la CUQ, boues primaires et secondaires de la station d'épuration des eaux usées de Valcartier, boues de levure et boues d'amidon, a permis de constater que ces milieux ne perdent pas leur faculté toxique, point particulièrement important sachant que l'intérêt de ce germe est bien son entomotoxicité. Par ailleurs, ce sont les boues d'amidon qui ont permis de produire un biopesticide plus efficace. Il est cependant important de noter que les boues de la CUQ ont permis d'obtenir des résultats concurrentiels. Les boues primaires de Valcartier et les boues de levure n'ont, par contre, donné que des résultats faibles. De plus, les boues municipales de la CUQ ont une très forte capacité de tamponner le pH, l'empêchant ainsi de subir une grande variation. Cela a été également vérifié dans le cas des boues d'amidon. Les nombres des cellules et des spores obtenus dans les boues qui sont relativement importantes peuvent être améliorés par l'hydrolyse des boues. Or, l'hydrolyse tant acide que basique des boues peut entraîner une accumulation de résidus pouvant influencer négativement la croissance et la sporulation de Bt, alors que l'hydrolyse des boues par des enzymes des boues est fortement recommandée.

Les boues de la CUQ sont des boues épaissies riches en matières organiques pouvant être utilisées par les micro-organismes comme source de carbone; leur concentration en ST est de l'ordre de 46 g/l. Cependant, une concentration trop élevée de ces solides peut influencer, d'une part, le transfert de l'oxygène et la mobilité des bactéries et d'autre part, la disponibilité des éléments nutritifs dans le milieu de culture. Ce qui peut affecter la productivité de Bt. Les travaux d'optimisation des ST réalisés aux cours de cette étude ont permis de montrer qu'une concentration des ST trop élevée (46 g/l) ou trop faible (10 g/l) influence négativement la croissance et l'entomotoxicité de Bt. Par ailleurs, un optimum de 26 g/l permet une meilleure efficacité du biopesticide Bt. Les concentrations des cellules obtenues sont de l'ordre de 5.0x109 UFC/ml avec un pourcentage de sporulation de 96%. De même, le potentiel entomotoxique atteint est plus élevé (12970 UI/µl) que celui habituellement obtenu dans le milieu soya (12600 UI/µl).

# 7.2 Effet de souche naturelle de B. thuringiensis

La comparaison, tant en fermenteur qu'en erlenemeyer, de l'utilisation des boues municipales de la station d'épuration de la CUQ comme substrats de croissance des 2 bacilles Bta (souche isolée à partir des boues) et Btk (souche de référence appartenant aux sérotypes kurstaki) et de l'utilisation des cultures de ces mêmes souches sur le milieu synthétique de soya a permis de constater que les boues des eaux usées constituent un milieu efficace pour la croissance de ces deux Bt en produisant de bonnes concentrations de cellules et de spores avec des pourcentages de sporulation élevés. De même, la comparaison de la culture de ces deux souches Bta et Btk dans les boues a permis de constater une augmentation de la concentration des cellules et des spores ainsi que du potentiel entomotoxique dans le cas du Bta.

# 7.3 L'effet de l'inoculum

L'inoculum est un paramètre clé dans la production de Bt par fermentation dans divers milieux. Il peut entraîner une faible efficacité du biopesticide comme il peut l'améliorer. Ceci est aussi vrai pour l'obtention du biopesticide Bt par fermentation dans des boues. Les résultats présentés dans cette étude ont démontré que la préparation de la préculture dans le même substrat que le milieu de production finale de Bt permet non seulement d'améliorer la croissance et l'entomotoxicité de Bt mais également de réduire la phase de latence et d'augmenter le taux de croissance spécifique. Le taux de croissance spécifique est passé de 0.26 h-1 dans le cas d'une préculture dans le TSB à 0.32 h-1 dans le cas de l'utilisation des boues de la CUQ.

Dans le même ordre d'idées, il a été clairement constaté au cours de ce travail que le pourcentage d'inoculation initiale est un facteur déterminant dans la production de Bt et qu'un taux de 2% permet d'obtenir une amélioration de la croissance de ce micro-organisme entomopathogène. L'entomotoxicité atteinte est de 12900 UI/µl; le pourcentage de sporulation est de 96%. Alors qu'un pourcentage d'inoculation de 4% et plus entraîne une diminution de la croissance de Bt et du potentiel entomotoxique. Ces résultats devront donc être pris en considération lors d'une optimisation éventuelle de la production du biopesticide Bt en fermenteur en utilisant un substrat à base de boues de station d'épuration des eaux usées.

# 7.4 Effet de la technique de la double inoculation

La double inoculation est une nouvelle méthode développée pour la première fois au cours de cette étude pour la production de Bt. Elle est simple et facile à manipuler et rendue possible grâce aux caractéristiques physiologiques de Bt et à la nature complexe des boues. L'utilisation d'un deuxième inoculant est d'une grande importance pour l'amélioration significative du nombre de cellules, du nombre de spores et du potentiel entomotoxique final. En effet, les concentrations des cellules et des spores obtenues en fermenteurs sont de l'ordre de 3.8x1011 UFC/ml. Le pourcentage de sporulation est de 97% et le potentiel entomotoxique est de 15800 UI/µl. De plus, l'utilisation de la deuxième inoculation permet d'éviter les phases d'anaérobies qui peuvent être engendrées par une forte concentration des cellules au cours de la sporulation (la concentration de O2 reste supérieur à 4 ppm). À noter que la sporulation est une phase très exigeante en matière d'aération dans le cycle biologique de Bt. L'emploi de la double inoculation permet également une utilisation rationnelle des éléments nutritifs, ce qui réduit la quantité de substrat utilisé pour la production de Bt, sachant que le milieu de culture constitue 35% à 50% du coût de production de Bt.

La réalisation de la deuxième inoculation dans le surnageant des boues et dans les boues qui ont subi un traitement enzymatique permet de constater que la croissance du deuxième inoculant est probablement supportée par deux phénomènes. D'une part, par la production enzymatique au cours de la fermentation de Bt qui facilite l'hydrolyse des boues qui sont très riches en éléments nutritifs difficilement biodégradables. D'autre part, par la libération des protéines intracellulaires après sporulation dans le milieu de culture. J'ai obtenu une concentration des cellules de l'ordre de 4.3x107 UFC/ml dans les boues. Le test d'entomotoxicité a permis d'obtenir un potentiel entomotoxique de 7827 UI/µl.

L'optimisation des différents paramètres pouvant influencer la double inoculation a permis de constater qu'un pourcentage d'inoculum d'environ 1% utilisé après 15 h permet d'obtenir non seulement une meilleure croissance de Bt mais également un meilleur potentiel entomotoxique. La réalisation après 15h de la deuxième inoculation permet, d'une part, au premier inoculant d'atteindre la phase de sporulation et, d'autre part, au deuxième inoculant d'atteindre sa maturation. Cela s'est fait tout en respectant le temps de fermentation optimum qui est de 48h. De plus, une concentration des ST dans les boues de 35 g/L permet d'atteindre une meilleure

croissance des cellules et des spores. La concentration finale des cellules et des spores est respectivement de 3.9x1012 UFC/ml, de 3.7x1012 UFC/ml. Le test d'entomotoxicité a permis d'obtenir un potentiel de 15580UI/μl. La double inoculation a permis également une bonne amélioration de l'obtention des cellules et des spores dans le cas des boues d'amidon. Le nombre des cellules, des spores et le potentiel entomotoxique ont été plus élevés dans ce dernier cas (1.2x1012UFC/ ml, 14984 UI/μl).

Certes, la double inoculation est une technique qui a permis d'améliorer le nombre de cellules et de spores obtenu au cours de la fermentation de Bt dans les boues plus que le potentiel entomotoxique. Il est, cependant, important d'approfondir l'étude de cette technique en fermenteur en variant les différents paramètres qui peuvent interagir avec la réalisation de la deuxième inoculation, cela dans le but d'améliorer l'entomotoxicité finale de Bt.

Afin d'expliquer l'accroissement du rendement par la deuxième inoculation, il serait intéressant d'étudier la production enzymatique au cours de la fermentation de Bt dans les boues. De plus cette technique peut être jumelée à des procédés de fermentation à alimentation continue, cela pourrait donc avoir un impact positif sur la production de  $\delta$ -endotoxine.

En somme, il est pertinent de souligner que des souches différentes (Bta et Btk) cultivées sur différents types de milieux (boue de CUQ, Boue secondaire et primaire de Valcartier, boue d'amidon, boue de levure) ne perdent pas leur faculté toxique, point particulièrement important sachant que l'intérêt de ce germe est son entomotoxicité. Ainsi, l'utilisation de ces milieux peut être une solution pour la réduction du coût de production de ce biopesticide, mais aussi une solution à l'élimination des boues des eaux usées qui sont produites à des centaines de milliers de tonnes par an dans le Canada. Ce qui rendra alors les biopesticides à base de Bt plus compétitifs pour la lutte contre les insectes ravageurs.

De plus, la recherche d'autres substrats à base d'amidon peut être d'une grande importance dans le cas d'une production à grande échelle. De même, l'étude plus approfondie de mélange de substrats riches en protéines et/ou en glucides et où les proportions C/N seront plus contrôlés, pourrait donner des résultats intéressants. L'oxygène est également un paramètre important pour la sporulation, différentes concentrations de ce dernier doivent être testées en fermenteur afin d'optimiser ce paramètre tout en tenant compte du facteur agitation qui est toujours présent et qui peut également varier.

# RÉFÉRENCES



# **RÉFÉRENCES**

**Abdel Hameed A. 1992.** Effect of amino acids in defined media on growth of *Bacillus thuringiensis* H-14. Acta-Pharmaceutica-Fennica. 101 (4): 221-226

Abdel Hameed A., G. Carlberg, et O. El-Tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-IV. Characterization of fermentationconditions for  $\delta$ -endotoxin production Word Jornal of Microbiology and Biotechnology 7: 231-236.

**Abdel Hameed A, G. Carlberg et OM. El-Tayeb. 1990.** Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt: II. Ultrastructure studies. World Journal of Microbilogy & Biotechnology 6(3): 305-312.

Anderson T.B. 1990. Effect of Carbon: Nitrogen ratio and oxygen on growth Kinetics of *Bacillus thuringiensis* and yield of bioinsecticidal cristal protein Msc Thesis, University of Western Ontario, Canada.

**APHA, AWWA ET WPCF. 1989.** Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters. 17<sup>ième</sup> édition. American Public Health Association, Washington, D. C. U.S.A.

**Arcas, J. 1984.** Biotechnol. Lett. 6 (8), 495-500

Armstrong, J. A. et W. G. H. Ives. 1995. Insectes forestiers ravageurs au Canada. Directeur de publication. Ressources naturelles Canada, Service canadien des forêts, Direction des sciences et du développement durable, Ottawa. 732 p

Aronson, J.N. 1976. Ammonia assimilation and glutamate catabolism by *Bacillus thuringiensis*, in Microbiology (éd. D. Schlesinger), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.9-444.

Aronson, A.I., Beckman, W., and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiological reviews 50: 1-24.

Aronson, J.N., D.P. Borris, J.F. Doerner, E. Akers. 1975.  $\gamma$ -aminobutyric acid pathway and modified tricarboxylic acid cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol., 30: 489-92.

Atlas, R. M. et R. Bartha. 1993. Microbial Ecology, fundamentals and applications, Third Edition, The Benjamin/Cummings Pblishing Company Inc., Redwood City, pp: 467-471.

Avignone-Rossa, C., J. A. Arcas et C. F. Mignone. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxine production in oxygen limited and non-limited cultures. World Journal of Microbiology and biotechnology, 8:301-304.

- Avignone-Rossa, C. et C. F. Mignone. 1995. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Mol. Biotechnol. 4: 55-71.
- Bailley, G.W., Swank et H.P. Nicholson. 1974. Predicting Pesticide Runoff from Agricultural Land: A Conceptual Model. J. Environ. Qual., 3:95-102.
- **Beegle, C. C. 1990.** Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Dans: Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. U.S.A. American Chemical Society, p. 14-21.
- Benoît, T. G., G. R. Wilson et C. L. Baugh. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. Lett. Appl. Microbiol., 10: 15-18.
- Bernhard, K. et R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: Entwistle, P. F., Cory, J. S. Baily, M. J. and Higgs, S. (éd.), *the Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and practice, John Wiley &sons New York, États-Unis, pp. 256-267.
- **Black, K. G. et S. J. Snyman. 1991.** Biomass yield and insecticidal activity of a local *Bacillus thuringiensis* isolate in six fermentation media. Proceedings of the South African Sugar Technologist's Association. June: 77-79.
- Blais, J.F. 1999. Assainissement des eaux usées. INRS-ETE, Université du Québec. Chapitres 6-11.
- Blais, J. F., R. D. Tyagi et J. C. Auclair. 1993. Bioleaching of metals from sewage sludge: microorganisms and growth Kinetics. Water Research, 27 (1): 101-110.
- Borris, D.P. et J.N. Aronson. 1969. Relationship of L-alanine and L-glutamate dehydrogenases of *Bacillus thuringiensis*. Biochim. Biophys. Acta, 191: 8-716.
- Bourque, S. 1995. Caractérisation biotechnologique de souches de *Bacillus thuringiensis*, thèse présentée à la faculté des études supérieures de l'université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D).
- **Burges**, H. D. 1986. Production and use of pathogens to control insects pests. Journal of Applied Bacteriology. Symposium supplement, p. 127S-137S.
- Burges, H. D. et N. W. Hussey. 1971. Microbial control of insects and mites. Academic Press, New York. 861p.
- Calam, C. T. 1976. Starting investigational and production cultures. Process Biochem. 1976: 7-12.
- Carlton, B. C. 1990. Economic considerations in marketing and application of biocontrol agents. Dans: UCLA Symposium on molecular and cellular biology, new direction in biological control. Los Angeles, Ca, p. 4419-4434.

Carlton, B. C. et J. M. Gonzalez Jr. 1984. Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. Plasmid, 11: 246-252.

Ceron, J., Ortiz, A. Quintero, R. Guereca, L. and Bravo, A. 1995. Applied and environmental microbiology, 61 (11): 3826-3831.

Charles J.F. 1983. Action de l'endotoxine de *Bacillus thuringiensis* Var. israelensis sur la culture de cellules de *Aedes aegypti* L. Ann. Microbiol. (inst. Pasteur), 134A, 365-381.

Chaufaux, J. M. Marchal, N. Gilois, I. Jehanno et C. Buisson. 1997. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travaers le monde. Can. J. Microbiol. 43:337-343.

Chilcott, C. N. et J. S. Pillai. 1985. The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1: 327-332.

Commercializing Biopesticides, Applied Product and Trangenic plants. Proc. Conf., 22-24 Jan. 1996. Wachington D.C.. Int. Business Communications Southborough, Ma. USA.

Couillard, D. et Y. Grenier. 1989. Forest management: trees response to wastewater sludge fertilization. Journal of Environmental Management, 28: 235-243.

Couillard, D. et Y. Grenier. 1987. Alternative à la gestion des boues résiduaires municipales : recyclage en sylviculture. Sciences et Techniques de l'eau, 3 : (20) 215-220.

**Daoust, R. 1990.** Commercialization of bacterial insecticides. Dans VII International colloquium on invertebrate pathology and microbial control. Australia, p. 7-11.

**De Barjac, H. and Bonnefoi. A. 1962.** Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type B. *thuringiensis*. Entomophaga. 7: 7-31.

**Debabov, V.G. 1982**. In: The Molecular Biology of Bacilli, vol. 1, *Bacillus subtilis*. D.A Dubnau, ed., Academic Press, New york, p. 331.

**Degrémont. 1989.** Mémento technique de l'eau. Neuvième édition, Rueil-Mamaison tomes 1 et 2, 1459p.

**Dulmage,H. T., J. A. Correa et G. Gallegos-Morales. 1990.** Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* through standardization and fermentation development. Dans: de Barjac, H. et D. Sutherland (éd.), Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. New Brunswick, NJ, Rutgers University Press, p.110-133.

**Dulmage**, H. T. 1981. Production of microbial insecticides by fermentation. Dans: H. D. Burges (éd.), Microbial control of pests and plant diseases. London, Academic Press, p.143 - 222.

Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus thuringiensis var.

alesti. Journal of Invertebrate Pathology, 15: 232-239.

**Dulmage, H. T., O. P. Boening, C. S. Rehnborg et G. D. Hansen. 1971.** A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. Journal of Invertebrate Pathology, 18:240-245.

**Dulmage, H. T., J. A. Correaet G. Gallegos-Morales. 1981.** Production of bacteria for biological control of insects. Dans: G. C. Papavizas (éd.), Biological control of crop production. Totowa, N. J. Allanheld, Osmun and co. p. 129.

**Dulmage, H.T. et R.A. Rhodes. 1971.** Production of pathogens in artificial media. Dans H. D. Burges et N.W. Hussey (éd.), Microbial Control of Insects and Mites. New Yyork, Academic Press, p. 507-540.

**Ejiofor, A. O. 1991.** Production of *Bacillus thuringiensis* Serotype H-14 as bioinsecticide Using a mixture of 'Spent' Brewer's Yeast and Waste Cassava Starch as the Fermentation Medium. Academy Science Publishers, Discovery and Innovation No3/2/, p.85-88.

Ejiofor, A. O. et N. Okafor. 1989. Production of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on raw material media from Nigeria. Journal of Applied Bacteriology, 67: 5-9.

**Ejiofor, A. O. et N. Okafor. 1988.** The production of *Bacillus sphaericus* 2362 using fermented cowpea (Vigna unguiculata) medium containing mineral substitutes from Nigeria. MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 4: 455-462.

Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey et S. Higgs (éd.). 1993. The Bacillus Thuringiensis, An Environnement Biopesticide, Theory & Practice. Johns Wiley & Sons Ltd, New York, États-Unis.

Environnement Canada. 1990. Recommandations sur la qualité des eaux pour l'atrazine au Canada. Étude No 168, Série scientifique. Direction générale des eaux intérieures, Direction de la qualité des eaux, Ottawa, Ontario, p.101.

Environnement Canada. 1987. Recommandations pour la qualité des eaux au Canada. Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement, chapitre 6.

Environnement Canada. 1985. L'épandage des eaux usées traitées et des boues d'épuration d'origine urbaine. Service de la protection de l'environnement. Guide SPE 6-EP-84-1.

**Faust, R. M. and L.A. Bulla, Jr. 1982.** Bacteria and their toxins as insecticides. E. Kurstak ed. Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, New York. Pp. 75-208.

Fisher, W. S. 1993. Pesticides for tomorrow. American Nurseryman, p. 77-80.

Foda, M. S., H. S. Salama et M. Selim. 1985. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. Applied microbiology and Biotechnology, 22: 50-52.

Frankenhuyzen. 1994. The Can. Entomologist. 126: 1061-1065.

Freitelson, J. S., J. Payne, et L. Kim. 1992. 'Bacillus thuringiensis: Insects and beyond'. Biotechnology, 10: 271-275.

Fukumoto, J., T. Takarazuka, T. Yamamoto, Y. Amagasaki et D. Tsuru. 1974. Process for producing detergent resisting alkaline protease. Brevet américain no. 3838009.p5.

**Gelernter, W. 1990.** *Bacillus thuringiensis*, bioengineering and the future of bioinsecticides. Dans: Brighton crop protection conference. 7A3: 617-624.

Georgis, R. 1997. Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture. Dans: Evans, H.F. (éd.), 1997 BCPC Symposium proceedings no. 68: Microbial insectides: Novelty or Necessity?, British Crop Protection Council, Conventry, Royaume-Uni, pp. 243-252.

Gill, SS., Cowles, E.A et Pietrantonio, P.V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* entoxins. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.

Goldberg, L. J. et J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News. 37: 355-358.

Gould. G. W. 1969. The bacterial spore. Academic Press, New York, Etats-Unis, 724p.

Gouvernement du Québec. 1983. Rapport du groupe de travail sur le programme d'assainissement des eaux du Québec. Ministère de l'environnement. Québec, Canada.

Halvorson, H. G. 1957. Rapid and simultaneous sporulation. J. appl. Bact., 20(3): 305-314.

Hanson, R.S., J. Blicharska, et J. Szulmajster. 1964. Relationship between the tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of B. subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 17:1-7.

Hardy, Y., M. Mainville, D. M. Schmitt. 1978. Atlas de la défoliation causée par la Tordeuse des bourgeons d'épinettes dans le Nord Est de l'Amérique du Nord. Ministère des Approvisionnements et services, Canada. 54p.

Harris, J.G. 1999. Pesticide in perspective CAB international.

**Harris, J.G. 1997.** Microbial insecticides- an industry perspective. In: Evans, H.F. (éd.) 1997. BCPC Symposium Proceedings no. 68 Microbial insecticides: Novelty or Necessity?, British Crop Protection Council, Conventry, Royaume-Uni, pp. 41-50.

Hashimoto, S; M. Fujita et K. Terai. 1972. Stabilization of waste-activated sludge through the anoxic-aerobic digestion process. Biotech. Bioeng., 24: 1789-1802.

Hertlein, B.C., R. Levy and T.W. Miller Jr. 1981. Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. Developments in industrial Microbiology. 22: 53-60.

Höfte, H. Et H.R. Whitely. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbial Res. 53: 242-255.

- Hockenhull, D. J. D. 1980. Inoculum developpement with particular reference to Aspergillus and Penicillium, p. 1-24. In J. E. Smith, D. R. Berry, and B. Kristiansen (ed), Fungal biotechnology, series no.3. Academic Press, In., New York.
- Howse G. M. 1995. Insectes ravageurs dans la région de l'Ontario. Editors. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service p. 24-26.
- Volney, W.J.A.; Nealis, V.G.; Howse, G.M.; Westwood, A.R.; McCullough, D.R.; Laishley, B.L., , Northwest Region, Northern Forestry Centre, Edmonton, Alberta. Information Report NOR-X-342
- **Huber, H. E. et P. Lüthy. 1987.** *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: composion and activition. In: Davidson, E. W. (éd.), Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases, Allenheld, Osmun, p. 209-234.
- Hudak, J et A.G. Raske. 1995. Insectes forestiers dans la région de Terre Neuve et du Labrador. p.1-9.
- Kang B.C. SY. Lee, HN. Chang. 1992. Enchanced spore production of *Basillus thuringiensis* by fed batch culture. Biotechnol lett. 14: 721-726.
- **Keil, C. B. 1991.** Field and laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of fly pests of mushrooms. Jornal of Economic Entomology, 84 (4): 1180-1188.
- Klausner, A. 1984. Microbial insect control, Biotechnology, 2: 408
- Knowles, B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Horsnell, J. Carrol, G. Menestrina et D. J. Ellard. 1989. A cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. FEBS Letters. 244: 259-262
- Krieg, A et Miltenburger, H. G. 1983. Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: en neuer. Gegennuber larven Von Coleoptern wirksamer pathotyp. Z. Angew. Ent. 96: 500-508.
- **Kuppusamy M. and K. Balaraman. 1991.** Effect of corn-steep liquor on growth and mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var israelensis de Barjac 1978 and *Bacillus sphaericus* Neide 1904. Indian Journal of Experimental Biology 29(2): 187-189.
- Larget, I et debarjac, H. 1981. Spécificité et principe actif de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Bull. Soc. Path. Exot. 74: 216-227.
- Lecadet, M.M. 1965. Isolement et caractérisation de deux protéases des chenilles de Pieris brassicae L, et étude de leur action sur l'inclusion parasporale de *Bacillus thuringiensis*. Thèse de Doctorat ès Sciences. Paris.
- Lachhab, K., R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* Biopesticides using Sewage Sludge as a Raw Material: Effect of inoculum and sludge solids concentration (accepted).

Lacoursière, J. et J. Boisvert. 1994. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Laboratoire de recherche sur les arthropodes piqueurs. Université du Québec à Trois-Rivières, 74 pages.

**Lereclus, D., C. Bourgouin, M. M. Leccadet, A. Klier et G. Rapoport. 1989.** Role, and molecular organization of genes coding for the parasporal δ-endotoxine of *Bacillus thuringiensis*. In regulation of Procaryotic Development (Smith, I., Slepecky, R. A. and Setlow, P., eds.), pp. 255-276, American Society for Microbiology, Washington, Etats-Unis, pp. 255-276.

Lessard S. et D. G. Bolduc. 1996. L'insecticide *Bacillus thuringiensis* et la santé publique, document de support à l'avis de santé publique. Comité de la santé de Québec. 70p.

Lisansky, S. G, R. Quinlan et G. Tassoni. 1993. The *Bacillus thuringiensis* production handbook. CPL Press, Royaume Uni, p. 1-124

Luthy, P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol letters, 8,1-7.

McKenny, C. 1991. B. thuringiensis: Keeps bugs from bouncing back. The Grower, 8: 22-24.

McPherson, S.A., Perlack, F.J., Fuchs, R.L., Marrrone, P.G., Lavrick, P.B. et Fischoff, D.A. 1988. Characterization of the coleopteran specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Bio. Technology. 6: 61-66.

Meadows, M.P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 193-220.

Mercier, J. C. 1985. Protection of the forests: a social and economic imperative. Forestry Chronicle, 61: 378-381.

Mettus A.M., And A. Macaluso. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxine Genes during Vegetative Growth. Applied and Environmental Microbiology, vol.56 No. 4: p. 1128-1134.

Meunier, N. 1999. Évaluation du potentiel de protéases bactériennes à partir de boues municipales. Mémoire présenté à l'INRS-EAU pour l'obtention de grade de Maîtrise és sciences (M.Sc.).

Michaelis, L. et M.L. Menten. 1913. The kinetics of intervertin action. Biochem. Z., 49: 333-369.

Ministère de l'Environnement du Québec. 1989. Méthode de digestion des boues d'épuration 89.12/213-mét.1.3. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.

Ministère de l'Environnement du Québec (MENVIQ). 1986. Sédiments-Détermination de l'azote et du carbone total, Analyse élémentaire (*CHN*) 86.09/305. Ministère de l'environnement du Québec, Québec.

Moraes, I., Santana, M. and Hakka, C. 1980. The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. Advances in Biotechnology, Proceedings of the 6<sup>th</sup> International

Fermentation Symposium, London, Canada, Vol. 1, pp. 75-79.

Morris, O.N., V. Converse, P. Kanagaratnam et J. S. Davies. 1996. Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai (HD 1330). J. Inv. Pathol., 67: 129-136.

Mostaghimi, S., T. M. Younos et U. S. Tim. 1992. Effects of sludge and chemical fertilizer application on runoff water quality. Water Ressources bulletin, American Water Ressources Association, 28(3): 545-552.

Mummigatti, S. G. et N. Raghunathan. 1990. Influence of media composition on the production of  $\delta$ -endotoxine by *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 55: 147-151.

**Murrell, W. G. 1961.** Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. In: Microbial reaction to environment, 11<sup>th</sup> symposium of the society for society for general microbiology held at the royal institution, London 1961, Cambridge University Press, Londres, pp. 100-150.

Nishitsutsuji-Uwo, J., A. Ohsawa et M.S. Nishimura. 1977. Factors affecting the insecticidal activity of  $\delta$ -endotoxine of *Bacillus thuringiensis*. J. Inv. Pathol., 29: 162-169.

**Obeta, J.A. and N. Okafor. 1984.** Factors affecting the fermentation of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Canadian Journal of Microbiology. 29: 704-706.

Obayashi A. W. et A. F. Gaudy. 1973. Aerobic digestion of extracellular microbial polysaccaharides. J. Wat. Pollut. Control Fed., 45 (7): 1584-1599.

Okafor, N. 1987. Industriel microbiology. Ile-Ife: University of Ife Press Ltd. 413.

Otvos, I. et S. Vanderveen. 1993. Environmental repport and current status of *Bacillus thuringiensis var. Kurstaki* use for control of forest and agricultural insect pests. Ministère des forêts, province de la Colombie Britannique et Forêt-Canada. 81 pages.

**Pearson, D. et O. P. Ward. 1988.** Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis* and development of media for production of protein crystal endotoxin. Biotechnology Letters, 10: (7) 451-456.

**Pelczar, M.J. et E.C.S. Chan. 1981**: Éléments de microbiologie. Traduit et adapté par J. Fontaine., Les Éditions HRW Ltée, Montréal, Canada, 515p.

**Pelczar, M.J. et E.C.S. Chan et Krieg. 1993.** Microbiology Concepts and Applications McGraw-Hill Inc., New York, Etats-Unis, p. 896.

Pelmont, J. 1993. Enzymes. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, 605p.

Préfontaine. G. Fast, P. Lau, P.C.K., Hefford, M.A., Hanna.Z. et Brousseau, R. 1987. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2808-2814.

- Ribier, J., and M.M. Leecadet. 1981. *Bacillus thuringiensis* Var. Berliner 1715. Isolement et caractérisation de mutants de sporulation. C.R. Acad. Sci. Ser. III 292: 803-808.
- Rossa, C.A. and Mignone, C. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limeted and non-limited cultures. World journal of microbiology and biotechnology, 8, 301-304.
- Roques, H. 1979. Fondements théoriques du traitement biologique des eaux VI et V2. Paris techniques et documentation, 1813p.
- Rowe, G.E. 1990. Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London, Ontario, Canada, pH. Doc. 295p.
- Rowe, G.E. et A. Margaritis. 1987. Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. Critical Reviews in Biotechnology, 6(1):87-127.
- Sachdeva, V., R.D. Tyagi and J.R. Valéro. 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilisation/disposal. Water Sci. Technol. 42(9), 211-216.
- Sachdeva, V., R.D. Tyagi et J.R. Valéro. 1999. Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. Devel. Microbiology, 3:363-375.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H.T. Dulmage et A. El-Sharaby. 1983a. A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. Entomophaga, 28 (2): 151-160.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H.T. Dulmage et A. El-Sharaby. 1983b. Novel fermentation media for production of delta-endotoxines from *Bacillus thuringiensis*. J. of Invert. Pathology. 41: 8-19.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H.T. Dulmage et A. El-Sharaby. 1983c. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Zentralblatt fuer Microbiologie, 138: 553-563.
- **Salama, H. S. et O. N Morris. 1993.** The use of *Bacillus thuringiensis* in developing contries. Dans P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. et S. Higgs (éd.) *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and practice. John Wiley & sons, Great Britain, pp. 237-253.
- Sanchis, V., J. Chaufaux et D. Lereclus. 1996. Amélioration biotechnologique de *Bacillus thuringiensis*: les enjeux et les risques. Les Annales de l'institut Pasteur, Actualités, 7(4), 271-284.
- **Sakharova, Z. V., I. L. Rabotnova et M. P. Khovrychev. 1989.** Growth and spores formation in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. Microbiologiya (Engl. Transl.), 54: 483-488.
- Scherrer, P., P. Lüthy et B. Trumpi. 1973. Production of  $\delta$ -endotoxine by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. Applied Microbiology 25(4): 644-646.

Siegel, J. P. 2001. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis* Based Insecticides. Journal of Invertebrate Pathology 77, 13-21

Silvy. C. et G. Riba. 2001. Les biopesticides : une grande famille. Biofutur 207: 22-24

**Smirnoff, W.A. 1983**. Residual effect of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticide treatments on spruce budworm (*Choristoneura fumiferana Clemens*). Crop Protection. 2: 225-230.

Stanier, R.Y., M. Doudoroff et ED. A. Adelberg. 1966. Microbiologie générale. Paris, Masson, 638 p.

**Steinhaus, E. A. 1963**. Insect pathology advanced treatise. Academic Press, New York, Vol. 1: 661 p.; Vol. 2: 689 p.

The Bacillus thuringiensis Production Handbook. 1993. CPL Scientifics Ltd. CPL Press, Newbury, U.K.

The 5<sup>th</sup> edition of CPL Scientific study on biopesticides. 2000. Volume 4

**Tirado-Montiel M.**, **R.D.Tyagi et J.R.Valéro.** 2001. Water treatment sludge as a raw material for production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Accepté pour publication dans Water Research.

**Tirado-Montiel M.**, **R.D.Tyagi et J.R.Valéro.** 1998. Production of *Bacillus thuringiensis* using waste materials. In: Bioconversion of Waste Materials to industrial Productions. A. M. Martin (éd.). Blackie Academie & Professional, London, p. 480-516.

**Tirado-Montiel Maria de Lourdes. 1997.** Utilisation de boues des usines de traitement comme moyen alternatif pour la production de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*, thèse de Doctorat présentée à l'INRS-ETE.

**Tyagi, R.D., J.F. Blais, N. Meunier et D. Kluepfel. 1993**. Biolixiviation des métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration. Essai en bioréacteur opéré en mode cuvée. *Can. J. Civ. Eng.* 20(1): 57-64.

**Tyagi, R. D. et D. Couillard. 1989.** Bacterial leaching of metals from sludge. Dans: P. E. Cheremisinoff (éd.), Encyclopedia of Environmental Control Technology, volume 3: Wastewater Treatment Technology. Houston, U. S. A., Gulf Publishing, p. 557-591.

Tyrell, D. J, L. A. Jr. Bulla, R. E. Jr. Andrews, K. J. Kramer, L. I. Davidson et P. Nordin 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J. Bact. 145, 1052-1062.

Quasim, R.S. 1982. Wastewater treatment plants. Planning, design and operations. New York, Holt, Rinhart and winstan, 726.

- **U.S. Environmental Protection Agency. 1979.** Sludge treatment and disposal. Process design manual. U.S.A., EPA-625/1-79-011.
- **U.S. EPA. 1987.**Water Quality Advisory. Aquatic Life and Human Health. Metolachlor. Draft document, Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standards Division.
- Vadeboncoeur, C. 1997. Éléments de physiologie bactérienne. Département de biochimie, Université Laval, Québec.
- Valéro, J. R. 1990. Microbiologie contre tordeuse : recherches à Forêts Canada-Région du Québec. L'Aubelle, 12:12-15.
- Valéro, J.R.; Mohammedi S.; Payne, N.J.; Tyagi, R.D. 1999. Microbial control of defoliating forest insects. In Recent Research Development in Microbiology. Research Signpost. 3: 455-464.
- Van Rie, J. McGaughey, W.H., Johnson, D.E. Barnett B.D. et Van Melleart, T. 1990. Mechanism of insects resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 247: 72-74.
- Vidyarthi, A. S.; Tyagi, R. D. et Valéro, J. R. 2001. Studies on the production of B. thuringiensis based biopesticide using wastwater sludge as substrate. Water Env. Res. (Submited for the publication).
- Vidyarthi, A. S.; Tyagi, R. D. et Valéro, J. R. 2001. Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water science and technology. Vol. 44. No. 10. (accepted for publication).
- Waalwijik, C., A. M. Dullemans, M. E. S. Van Workum, B. Visser. 1985. Molecular cloning and nucleotide sequence of 28Kd crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* Subsp. Israelensis. Nucl. Acids. Res. 13: 8206-8217.
- Ward E.S. et Ellar, D.J. 1987. Nucleotide sequence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 Kd delta endotoxin. Nucl. Acids. Res. 15, 71-75.
- Wayman, M. et S. R. Pareckh. 1990. Biotechnology of biomass conversion. Englewood Cliffs, New Jersey, États-Unis, 278p.
- Webber, M.D. 1988. Contrôle de la concentration des métaux lourds dans les sols après épandage de boues d'égout municipales: l'approche canadienne. Sci. Tech. Eau, 21 (1): 45-51.
- Webber, M.D. 1986. Épandage des boues d'épuration sur les terres agricoles une évaluation. Direction Générale de la recherche, Agriculture Canada, 42p.
- **WHO. 1985.** Tropical disease research (TDR), Seventh programme report on biological control of vectors. Geneva, World Health Organization, 10/1-10/16.
- Wong, L. et J. G. Henry. 1984. Decontaminating biological sludge for agricultural use. Water Science and technology, 17(4/5): 575-586.

**Xiao-Ming, Y and S.S. Wang. 1998.** Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a pratical perspective. Biotechnol. Appl. Biochem. 28: 95-98.

Yudina TG. OV. Salamakha, EV. Olekhnovich, NP. Rogatykh, NS. Egonov. 1992. Effect of carbon source on the biological activity and morphology of praspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. Microbiology 61: 402-407.



#### **GLOSSAIRE**

ST:

Solides Totaux

SV:

Solides volatiles

MES:

Matières en suspension

MVES:

Matières volatiles en suspension

CV:

Cellules viables

SPV:

Spores viables

SA:

Milieu soya, souche Bta

SK:

Milieu soya, souche BtK,

BA:

Milieu boues, souche Bta

BK:

Milieu boues, souche BtK

Bt:

Bacillus thuringiensis

**CUQM**:

Boues mixtes de la Communauté Urbaine de Québec

**CUQMA**:

Boues mixtes de la Communauté Urbaine de Québec + Boues d'amidon

**CUQML**:

Boues mixtes de la Communauté Urbaine de Québec + Boues de levure

**CUQMAL**:

Boues mixtes de la Communauté Urbaine de Québec + Boues d'amidon et Boues

de levure

UFC:

Unité Formant une Colonie

TSB:

Tryptic Soy Brouth

LC 50:

La concentration létale causant 50% de mortalité dans ce cas chez les larves de

TBE.

TBE:

Tordeuse des Bourgeons de l'Epinette.

ppm:

partie par million

**Dénaturation:** la première phase consiste à séparer le brin bicaténaire en deux brins monocaténaires, par rupture des liaisons Hydrogènes à une température de 94 °C;

**Hybridation:** elle consiste en l'appariement des amorces sur la séquence recherchée. Cela nécessite des conditions stringentes (concentration en sels, température...) qui permettent aux amorces de s'hybrider sur les brins matrices à la place désirée. La température optimale est en général de 5°C au-dessous du Tm (température de fusion de 50% de l'ADN). Une température d'hybridation trop élevée se traduit par un mauvais appariement des amorces, et une trop basse, par une fixation des amorces sur des séquences non spécifiques. La température Tm se calcul comme suit Tm = 2 (Adénine + Thymine) + 4 (Guanine + Cytosine). Il est préférable de choisir des amorces dont le Tm est presque identique;

**Polymérisation :** elle consiste en un allongement de l'amorce dans le sens 5'→3', à partir du brin monocaténaire matrice. Cet allongement se fait par la Taq ADN Polymérase (extraite de la bactérie de source chaude *Thermus aquaticus*), dont l'activité optimale se situe entre 70 et 80°C (on utilise généralement 72°C) et qui conserve son intégrité à 94°C au moment de la dénaturation. La Taq Polymérase agit en présence de Mg<sup>2+</sup> à une concentration bien spécifique.

# **ANNEXES**

#### **ANNEXES**

**Annexe I** Caractéristiques physico-chimiques des boues Tableau 8.1: Analyses chimiques des boues mixtes d'épuration de la CUQ

Paramètres	Boues mixtes	Boues mixtes	Boues mixtes	Boues mixtes
	10.07-97	12.01.98	03.09.98	11.01.00
pН	5.0	5.2	5.8	6.1
ST (g/l)	46	40	43	40
SV (g/l)	34.3	35.1	34.1	27.2
MES (g/l)	38.2	37.3	38.2	34.5
MVES (g/l)	24.5	30.0	32.0	25
$N_{t}$	23790	29800	30145	26560
$N-NH_3$ (mg/kg)	244	479	511	421
$C_t (mg/kg)$	227119	361640	352490	273008
$N-NO_2-NO_3$ (mg/kg)	5	12	10	7
$P_{t}$ (mg/kg)	10017	12951	9411	10975
$P-PO_4(mg/kg)$	5510	7981	7124	9240
C/N	9.5	12.13	11.69	10.27
Al (mg/kg)	9748	17333	9142	14243
Ca (mg/kg)	15843	22100	25731	17559
Cd (mg/kg)	0.5	0.7	0.8	0.52
Cr (mg/kg)	60.2	63.7	98.2	70.7
Cu (mg/kg)	144	268	186	304
Fe (mg/kg)	10754	14240	10218	15352
Mg (mg/kg)	1971	2532	2941	3112
Mn (mg/kg)	142	199	96	245
Ni (mg/kg)	17.3	22.0	19.7	13.48
K (mg/kg)	20.1	2170	1542	2824
Pb (mg/kg)	30.5	60.3	58.0	48.6
S (mg/kg)	7211	5002	3746	6112
Na (mg/kg)	1001	1110	2002	3165
Zn (mg/kg)	477	10300	970	650.2

Tableau 8.2: Caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes de la CUQ pour l'étude de la reproductivité

Paramètres	Boues mixtes			Boues mixtes
	06-01-1999	22-04-1999	14-07-1999	13-10-1999
pН	6.2	5.8	6.1	6.1
ST (g/l)	44	37	40	40
SV (g/l)	33.7	30.2	30.8	26.3
MES (g/l)	36.9	32.8	34.0	29.7
MVES (g/l)	31.1	29.8	27	25.3
$N_t(mg/kg)$	33457	38245	35543	32164
$C_t (mg/kg)$	392351	356491	358410	324150
$P_{t}$ (mg/kg)	10753	10245	11735	9450
C/N	11.72	9.32	10.08	10.07

Tableau 8.3: Caractéristiques physico-chimiques des boues secondaires de la CUQ

Paramètres	Boues secondaires de la CUQ
	01-09-2000
pН	6.0
ST(g/l)	29.7 g/l
SV(g/l)	20.2 g/l
MES (g/l)	25 g/l
MVES (g/l)	19.2 g/l
$N_t (mg/kg)$	40121
$N-NH_3$ (mg/kg)	862
$C_{t}$ (mg/kg)	390120
$P_{t}$ (mg/kg)	15754
$PO_4(mg/kg)$	12010
$N-NO_2-NO_3$ (mg/kg)	20
C/N	9.72
Al (mg/kg)	10730
Ca (mg/kg)	15564
Cd (mg/kg)	0.7
Cr (mg/kg)	101
Cu (mg/kg)	180
Fe (mg/kg)	11798
Pb (mg/kg)	30
K (mg/kg)	2957
Na (mg/kg)	3102
S (mg/kg)	7510
Zn (mg/kg)	397

Tableau 8 4: Analyses chimiques des boues d'épuration de la station de Valcartier

Paramètres	Boues primaires 02-06-98	Boues secondaires 02-06-98
pН	5.5	5.9
ST (g/l)	20.3	25.4
SV (g/l)	16.1	22.7
MES (g/l)	18.4	20.4
MVES (g/l)	17.2	21
$N_t(mg/kg)$	27130	21840
$P_{t}$ (mg/kg)	15785	26619
N-NH <sub>4</sub>	13750	24210
N-NO <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> (mg/kg)	< 15	< 20
$C_{t} (mg/kg)$	94654	152009
C/N	3.49	6.96
K (mg/kg)	3150	3525
Al (mg/kg)	8870	9198
Ca (mg/kg)	8630	10341
Cd (mg/kg)	2.0	1.9
Cr (mg/kg)	24.0	27.7
Cu (mg/kg)	580	654
Fe (mg/kg)	7854	9750
Mg (mg/kg)	2210	2960
Mn (mg/kg)	239	217
Ni (mg/kg)	14.0	12.9
Pb (mg/kg)	109	94
Zn (mg/kg)	130	205

Tableau 8.5 : Analyses physico-chimiques des boues d'amidon et de levure

Paramètres	D'Amidon	De levure
pН	5.4	5.7
ST (g/l)	26.3	14.5
SV (g/l)	21.3	10.2
MES (g/l)	23.7	11.7
MVES (g/l)	19.0	9.6
$C_{t}(\%)$	40.5	28.4
$N_t(\%)$	2.5	4.6
S (%)	0.4	6.1
$P_{t}$ (mg/kg)	43040	2100
C/N	16.2	6.17

Annexe II

Comparaison en fermenteur de la croissance de Bta et Btk dans les boues et le soya

Tableau 8.6: Comparaison de la croissance de Btk dans les boues de la CUQ et dans le milieu soya (

Temps	Soya: CV/ml	Soya: SPV/ml	Boues: CV/ml	Boues: SPV/ml
0	1,20E+06		1,40E+06	
4	6,10E+07		4,65E+07	
8	3,10E+08		2,50E+08	
12	4,80E+08	9,80E+07	3,60E+08	3,50E+04
15	5,50E+08	1,00E+07	4.00E+08	9,91E+07
24	5,90E+08	3,50E+08	4,20E+08	3,70E+08
36	1,26E+09	1,10E+09	5,80E+08	4,60E+08
48	1,60E+09	1,50E+09	6,20E+08	5,30E+08
60	1,70E+09	1,40E+09	6,40E+08	5,10E+08
64	1,68E+09	1,33 <sup>E</sup> +09	6,30E+08	5,80E+08
68	1,45E+09	1,21E+09	6,20E+08	5,60E+08
72	1,30E+09	1,18E+09	6,10E+08	5,50E+08

Tableau 8.7: Comparaison de la croissance des deux souches Btk, Bta dans les boues mixtes de la CUQ

Temps	Bta: CV/ml	Bta: SPV/ml	Btk: CV/ml	Btk: SPV/ml
0	1,50E+06	1,00E+00	1,40E+06	1,00E+00
3	1,90E+06	1,00E+00	1,70E+06	1,00E+00
6	4,50E+07	1,00E+00	5,10E+06	1,00E+00
9	1,07E+08	1,00E+00	4,30E+07	1,00E+00
12	4,06E+08	1,17E+07	1,00E+08	6,90E+06
15	5,90E+08	5,00E+07	2,70E+08	3,50E+07
24	7,50E+08	6,30E+08	3,70E+08	1,70E+08
32	7,90E+08	7,50E+08	3,90E+08	3,80E+08
36	7,70E+08	7,40E+08	4,00E+08	3,00E+08
39	8,00E+08	7,70E+08	4,30E+08	4,00E+08
42	8,50E+08	8,20E+08	4,60E+08	4,50E+08
45	8,70E+08	8,30E+08	4,80E+08	4,60E+08
48	9,70E+08	9,40E+08	4,50E+08	4,30E+08
51	9,40E+08	9,10E+08	4,70E+08	4,50E+08

**Tableau 8.8:** Évolution de  $O_2$  et de  $CO_2$  dans le cas de la comparaison des deux souches Bta et Btk

Temps (h)	O2 Bta	O2 Btk	CO2-Btk	CO2-Bta
0	6,35	6,42	0,06	0,03
3	6,02	5,66	0,28	0,03
6	5,85	2,34	0,67	0,03
9	4,15	2,19	0,48	0,25
12	1,91	4,11	0,33	0,5
15	0,5	4,32	0,18	1,79
24	4,72	5,87	0,15	0,73
31	4,8	5,53	0,11	0,24
48	4,97	6,26	0	0,03
65	5,66	6,21	0	0,1

Annexe III
Effet du type de boues sur la croissance de Bacillus thuringiensis (Bta, Btk)

Tableau 8.9: Boues primaires et secondaires de Valcartier (Souche Bta)

Bta	Boues primaire	es de Valcartier	Boues secondair	es de Valcartier
Temps (h)	VC/ml	SPV/ml	CV/ml	SPVC/ml
0	1,60E+05	1,00E+00	2,00E+05	1,00E+00
3	1,19E+05	1,00E+00	3,10E+05	1,00E+00
6	3,60E+05	1,00E+00	6,00E+06	1,00E+00
9	2,20E+06	1,00E+00	4,20E+07	1,00E+00
12	2,50E+06	1,00E+00	5,20E+07	3,60E+06
15	2,70E+06	1,00E+00	5,50E+07	7,00E+06
18	2,90E+06	5,60E+05	5,90E+07	9,80E+06
21	2,80E+06	8,80E+05	6,50E+07	2,10E+07
24	2,70E+06	1,30E+06	6,70E+07	5,30E+07
27	2,90E+06	2,10E+06	5,70E+07	5,20E+07
30	3,00E+06	2,60E+06	5,50E+07	5,30E+07
33	2,80E+06	2,70E+06	5,30E+07	5,20E+07
36	2,70E+06	2,50E+06	4,80E+07	4,70E+07
51	2,50E+06	2,40E+06	3,70E+07	4,80E+07
54	2,30E+06	2,20E+06	3,60E+07	2,20E+07
57	2,20E+06	2,10E+06	3,50E+07	2,10E+07
60	2,10E+06	2,00E+06	3,30E+07	1,80E+07

Tableau 8.10 : Boues primaires et secondaires de Valcartier (Souche Btk)

Btk	Boues primaire	es de Valcartier	Boues secondair	es de Valcartier
Temps (h)	VTC/mL	VSC/mL	VTC/mL	VSC/mL
0	1,20E+04	1,00E+00	1,00E+04	1,00E+00
3	1,38E+04	1,00E+00	1,28E+04	1,00E+00
6	7,27E+05	1,00E+00	6,90E+06	1,00E+00
9	2,13E+06	1,00E+00	1,09E+07	1,00E+00
12	2,14E+06	1,70E+05	1,43E+07	5,89E+06
15	2,19E+06	4,68E+05	1,68E+07	1,48E+07
18	2,20E+06	1,07E+06	1,90E+07	1,34E+07
21	2,22E+06	1,58E+06	2,51E+07	1,72E+07
24	2,23E+06	2,12E+06	2,78E+07	2,30E+07
27	2,21E+06	2,02E+06	2,70E+07	2,20E+07
30	2,08E+06	1,95E+06	2,54E+07	2,30E+07
33	2,15E+06	1,80E+06	2,32E+07	2,20E+07
36	1,80E+06	1,66E+06	2,81E+07	2,72E+07
51	1,70E+06	1,54E+06	2,72E+07	2,61E+07
54	1,80E+06	1,42E+06	2,60E+07	2,20E+07
57	1,60E+06	1,32E+06	2,58E+07	2,51E+07
60	1,50E+06	1,20E+06	2,37E+07	2,19E+07

Tableau 8.11 a: Boues mixtes de la CUQ (Q), d'amidon (A), de levure (L): Souche Bta

Temps (h)	CV(A)/ml	SPV(A)/ml	CV(Q)/ml	SPV(Q)/ml	CV(L)/ml	SPV(L)/ml
0	2,50E+06	1,00E+00	2,20E+06	1,00E+00	2,40E+06	1,00E+00
3	1,00E+07	1,00E+00	5,60E+06	1,00E+00	4,20E+06	1,00E+00
6	6,80E+08	1,00E+00	5,00E+07	1,00E+00	1,00E+07	1,00E+00
9	3,25E+09	1,00E+00	1,40 <b>E+</b> 08	1,00E+00	2,09E+07	1,00E+00
12	3,90E+09	2,00E+08	4,90E+08	2,90E+07	1,20E+08	2,80E+07
15	4,10E+09	2,20E+09	9,80E+08	3,40E+08	1,80E+08	1,10E+08
24	7,20E+09	5,10E+09	3,60E+09	3,00E+09	4,60E+08	3,40E+08
28	8,20E+09	6,80E+09	3,70E+09	3,40E+09	4,50E+08	3,60E+08
32	9,40E+09	9,20E+09	4,00E+09	3,90E+09	4,70E+08	4,30E+08
39	9,90E+09	9,40E+09	4,20E+09	4,10E+09	4,00E+08	3,10E+08
48	1,10E+10	1,07E+10	4,90E+09	4,50E+09	4,10E+08	3,80E+08
52	2,20E+10	2,10E+10	4,50E+09	4,40E+09	4,70E+08	4,30E+08

Tableau 8.11 b: Boues mixtes de la CUQ (Q), d'amidon (A), de levure (L): souche Btk

Temps (h)	CV(A)/ml	SPV(A)/ml	CV(Q)/ml	SPV(Q)/ml	CV(L)/ml	SPV(L)/ml
0	2,70E+06	1,00E+00	1,20E+06	1,00E+00	1,10E+06	1,00E+00
3	3,80E+07	1,00E+00	8,10E+06	1,00E+00	4,80E+06	1,00E+00
6	2,20E+08	1,00E+00	5,00E+07	1,00E+00	7,30E+06	1,00E+00
9	4,50E+08	1,00E+00	1,50E+08	1,00E+00	8,40E+06	1,00E+00
12	5,80E+08	9,00E+07	3,60E+08	9,00E+07	9,60E+06	9,00E+06
- 15	7,50E+08	2,90E+08	7,30E+08	6,90E+08	9,90E+06	9,80E+05
24	8,00E+08	6,80E+08	8,20E+08	8,00E+08	1,10E+07	5,10E+06
28	2,90E+09	2,70E+09	9,90E+08	9,40E+08	1,20E+07	9,10E+06
32	8,00E+09	7,80E+09	1,09E+09	9,90E+08	2,56E+07	1,16E+07
39	1,30E+10	1,10E+10	1,21E+09	1,07E+09	2,60E+07	1,25E+07
48	1,05E+10	1,01E+10	1,30E+09	1,10E+09	2,70E+07	1,30E+07
52	1,20E+10	1,10E+10	1,02E+09	1,00E+09	2,50E+07	1,07E+07

Tableau 8.12 : Évolution du pH dans le cas des boues de la CUQ, d'amidon et du milieu soya

Temps (h)	Boue	Amidon	soya
0	7,51	7,57	7,6
3	6,42	6,17	5,64
6	6,26	6,04	4,38
9	6,77	6,31	5,51
12	7,31	6,93	7,58
15	7,72	7,52	7,84
24	7,76	7,89	8,09
28	7,79	7,78	8,14
32	7,86	7,75	8,22
34	7,9	7,87	8,25
40	8,1	7,78	8,27
48	8,09	7,78	8,4

**Tableau 8.13 :** Étude de la croissance de la souche *Bta* dans le mélange de différents types de boues : CUQML, CUQMA, CUQMAL, CUQM

Bta	CUQ		CUQ-A	MIDON	CUQ-L	EVURE	-	MIDON- URE
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	5,00E+04	1,00E+00	4,80E+04	1,00E+00	4,70E+04	1,00E+00	4,90E+04	1,00E+00
3	3,00E+05	1,00E+00	8,60E+06	1,00E+00	6,00E+05	1,00E+00	7,10E+05	1,00E+00
6	2,10E+06	1,00E+00	5,80E+06	1,00E+00	4,30E+06	1,00E+00	3,05E+07	1,00E+00
9	9,90E+06	1,00E+00	7,70E+07	1,00E+00	2,50E+07	1,00E+00	1,90E+07	1,00E+00
12	3,10E+07	5,40E+06	7,30E+08	1,10E+08	7,70E+07	7,20E+06	9,90E+07	4,80E+07
15	4,40E+07	1,00E+07	1,10E+09	8,80E+08	2,80E+08	4,00E+07	4,50E+08	3,20E+08
18	7,00E+07	4,10E+07	3,10E+09	2,50E+09	4,40E+08	4,10E+08	8,10E+08	7,60E+08
21	9,90E+07	8,10E+07	5,40E+09	6,00E+09	4,90E+08	4,70E+08	1,22E+09	1,10E+09
24	2,30E+08	2,20E+08	9,50E+09	8,30E+09	5,10E+08	4,80E+08	5,40E+09	5,30E+09
27	4,80E+08	4,50E+08	4,80E+10	4,50E+10	6,90E+08	6,50E+08	7,50E+09	7,30E+09
30	5,10E+08	4,90E+08	5,10E+10	4,80E+10	8,70E+08	8,00E+08	8,80E+09	8,70E+09
33	6,30E+08	5,80E+08	5,50E+10	5,00E+10	1,06E+09	1,06E+09	1,21E+10	1,00E+10
36	7,50E+08	7,40E+08	6,30E+10	5,20E+10	2,90E+09	2,70E+09	4,90E+10	4,70E+10
40	8,00E+08	7,70E+08	7,20E+10	5,10E+10	5,00E+09	4,50E+09	8,10E+10	7,70E+10
44	2,60E+09	1,90E+09	7,10E+10	5,20E+10	4,50E+09	4,20E+09	8,00E+10	7,60E+10
48	2,20E+09	1,80E+09	7,20E+10	4,70E+10	4,90E+09	4,40E+09	7,50E+10	7,10E+10
52	2,00E+09	1,90E+09	7,00E+10	4,80E+10	4,90E+09	4,50E+09	8,00E+10	6,80E+10

**Tableau 8.14 :** Étude de la croissance de la souche *Btk* dans le mélange de différents types de boues : CUQML, CUQMA, CUQMAL, CUQM

							CUQ-A	MIDON-
Btk	CI	U <b>Q</b>	CUQ-A	MIDON	CUQ-L	EVURE	LEV	URE
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	4,20E+04	1,00E+00	4,20E+04	1,00E+00	4,60E+04	1,00E+00	5,00E+04	1,00E+00
3	9,10E+04	1,00E+00	9,50E+05	1,00E+00	1,50E+05	1,00E+00	7,30E+05	1,00E+00
6	8,10E+05	1,00E+00	4,00E+06	1,00E+00	2,11E+06	1,00E+00	1,45E+06	1,00E+00
9	7,70E+06	1,00E+00	2,10E+07	1,00E+00	8,70E+06	1,00E+00	4,50E+07	1,00E+00
12	9,10E+06	7,80E+06	1,51E+08	7,00E+07	8,10E+07	1,00E+07	7,80E+07	1,10E+07
15	1,21E+07	1,00E+07	2,80E+08	9,80E+07	9,70E+07	5,60E+07	9,10E+08	4,80E+08
18	4,00E+07	3,20E+07	4,80E+08	3,50E+08	1,13E+08	1,10E+08	1,35E+09	1,11E+09
21	9,00E+07	8,90E+07	6,90E+08	6,70E+08	2,26E+08	2,20E+08	4,20E+09	4,10E+09
24	1,23E+08	1,09E+08	9,70E+08	9,40E+08	3,50E+08	3,10E+08	7,50E+09	7,30E+09
27	2,40E+08	2,30E+08	1,03E+09	9,80E+08	4,00E+08	3,80E+08	8,70E+09	7,90E+09
30	2,80E+08	2,70E+08	2,04E+09	1,89E+09	4,90E+08	4,70E+08	1,29E+10	1,08E+10
33	5,40E+08	5,10E+08	4,30E+09	3,90E+09	5,20E+08	5,10E+08	2,00E+10	1,97E+10
36	7,60E+08	7,20E+08	6,70E+09	6,50E+09	7,80E+08	7,60E+08	2,03E+10	1,87E+10
40	9,80E+08	8,50E+08	9,80E+09	9,70E+09	9,00E+08	8,80E+08	3,50E+10	3,20E+10
44	9,80E+08	8,70E+08	1,10E+10	1,00E+10	8,90E+08	8,60E+08	3,40E+10	3,10E+10
48	7,80E+08	7,60E+08	1,09E+10	9,80E+09	9,00E+08	8,70E+08	3,50E+10	3,10E+10
52	8,90E+08	8,60E+08	9,90E+09	9,70E+09	8,60E+08	8,10E+08	3,30E+10	3,00E+10

## **Annexe IV**

Étude de la croissance des deux souches *Btk* et *Bta* dans les boues mixtes de la CUQ avec différent type de traitements : acide, alcalin et avec des enzymes

Tableau 8.15: Effet du traitement acide, alcalin et enzymatique des boues sur la croissance de Bta

Bta	Sans tra	itement	Ac	ide	alcalin		enz	yme
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,09E+04	1,00E+00	1,00E+04	1,00E+00	1,30E+04	1,00E+00	1,10E+04	1,00E+00
3	4,00E+05	1,00E+00	7,70E+05	1,00E+00	5,00E+05	1,00E+00	8,40E+05	1,00E+00
6	1,50E+06	1,00E+00	6,70E+06	1,00E+00	5,00E+06	1,00E+00	2,08E+06	1,00E+00
9	9,50E+06	1,00E+00	1,80E+07	1,00E+00	1,00E+07	1,00E+00	2,50E+07	1,00E+00
12	5,00E+07	5,40E+06	9,40E+07	1,00E+07	1,50E+08	1,20E+06	9,10E+07	2,80E+07
15	5,40E+07	1,00E+07	1,20E+08	7,80E+07	2,90E+08	3,00E+07	1,50E+08	1,20E+08
18	6,20E+07	4,10E+07	2,00E+08	1,50E+08	4,00E+08	3,40E+08	2,10E+08	1,60E+08
21	9,80E+07	9,60E+07	6,40E+08	6,10E+08	4,40E+08	3,70E+08	5,20E+08	5,00E+09
24	1,90E+08	1,70E+08	8,60E+08	8,40E+08	5,00E+08	4,80E+08	9,00E+08	8,10E+08
27	2,90E+08	2,50E+08	4,90E+09	4,50E+09	6,30E+08	5,50E+08	1,80E+09	1,70E+09
30	3,00E+08	2,90E+08	5,00E+09	4,80E+09	6,70E+08	6,00E+08	5,90E+09	5,50E+09
33	4,20E+08	3,80E+08	6,30E+09	6,20E+09	7,60E+08	6,80E+08	7,10E+09	7,00E+09
36	6,80E+08	6,40E+08	6,70E+09	6,50E+09	8,00E+08	7,70E+08	7,90E+09	7,70E+09
40	8,00E+08	7,70E+08	7,20E+09	6,80E+09	9,70E+08	7,80E+08	8,40E+09	8,10E+09
44	8,70E+08	7,50E+08	7,40E+09	6,90E+09	9,50E+08	7,70E+08	9,80E+09	9,10E+09
48	8,60E+08	7,60E+08	7,30E+09	6,70E+09	9,00E+08	7,80E+08	9,50E+09	9,00E+09
52	7,90E+08	7,70E+08	7,20E+09	6,80E+09	8,90E+08	7,60E+08	9,20E+09	9,00E+09

Tableau 8.16: Effet du traitement acide, alcalin et enzymatique des boues sur la croissance de Btk

Btk	Sans tra	itement	Ac	ide	alcalin		enz	yme
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV)/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,15E+04	1,00E+00	1,20E+04	1,00E+00	1,18E+04	1,00E+00	1,09E+04	1,00E+00
3	1,70E+05	1,00E+00	9,90E+05	1,00E+00	7,40E+05	1,00E+00	9,30E+05	1,00E+00
6	9,20E+05	1,00E+00	1,00E+06	1,00E+00	2,08E+06	1,00E+00	1,23E+06	1,00E+00
9	5,20E+06	1,00E+00	2,15E+07	1,00E+00	9,00E+06	1,00E+00	1,80E+07	1,00E+00
12	9,00E+06	6,80E+06	1,50E+08	1,00E+07	9,10E+07	2,80E+07	9,80E+07	7,80E+07
15	1,30E+07	1,00E+07	3,70E+08	7,80E+07	1,50E+08	1,00E+08	2,10E+08	1,90E+08
18	2,40E+07	1,50E+07	5,10E+08	3,00E+08	2,10E+08	1,50E+08	4,70E+08	4,60E+08
21	6,00E+07	5,20E+07	6,70E+08	5,70E+08	2,80E+08	2,50E+08	7,80E+08	7,60E+08
24	9,20E+07	9,10E+07	7,90E+08	6,00E+08	3,00E+08	2,80E+08	9,90E+08	9,80E+08
27	1,40E+08	1,30E+08	8,70E+08	7,90E+08	3,80E+08	3,70E+08	3,10E+09	2,90E+09
30	1,80E+08	1,70E+08	9,40E+08	8,20E+08	3,90E+08	3,80E+08	6,90E+09	6,70E+09
33	2,00E+08	1,90E+08	1,20E+09	1,00E+09	4,70E+08	4,60E+08	8,00E+09	7,20E+09
36	2,60E+08	2,20E+08	2,90E+09	2,60E+09	4,60E+08	4,40E+08	8,30E+09	7,30E+09
40	2,40E+08	2,10E+08	3,70E+09	3,40E+09	5,00E+08	4,80E+08	8,40E+09	7,10E+09
44	2,80E+08	2,20E+08	4,00E+09	3,50E+09	4,90E+08	4,80E+08	8,80E+09	7,30E+09
48	2,80E+08	2,20E+08	3,30E+09	3,10E+09	4,70E+08	4,60E+08	8,10E+09	7,20E+09
52	1,90E+08	1,80E+08	3,40E+09	3,30E+09	4,80E+08	4,70E+08	8,70E+08	7,30E+08

## Annexe V Étude de l'effet de la concentration des solides totaux des boues mixtes de la CUQ sur la

**Tableau . 17 :** Comparaison de la croissance de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* dans les mixe de CUQ: nombre de cellules en fonctions de la concentration des solides totaux (46 g/Litre, 36 g/Litre, 26 g/Litre,

croissance de Bta et Btk

20g/Litre, 10g/Litre) et du temps

			OT I	CDII/	CYT/ I	CDI//
Temps	CV/mL	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
	46 g/l	46 g/l	36 g/l	36 g/l	30 g/l	30 g/l
0	8.20E+06	1,00E+00	7.90E+06	1,00E+00	7,00E+06	1,00E+00
3	8,40E+06	1,00E+00	8,10E+06	1,00E+00	7,30E+06	1,00E+00
6	8,80E+06	1,00E+00	9,60E+06	1,00E+00	7,50E+06	1,00E+00
9	9,80E+06	1,00E+00	1,80E+07	1,00E+00	2,10E+07	1,00E+00
12	2,30E+07	2,00E+07	4,80E+07	1,00E+06	3,80E+07	6,00E+06
15	7,50E+07	1,20E+08	1,00E+08	1,40E+07	8,10E+07	5,70E+07
18	1,70E+08	1,60E+08	3,00E+08	9,20E+07	2,20E+08	2,00E+08
21	4,10E+08	2,30E+08	5,00E+08	4,60E+08	3,40E+08	1,80E+08
27	4,40E+08	4,00E+08	7,80E+08	6,10E+08	8,70E+08	5,70E+08
30	4,60E+08	3,50E+08	8,50E+08	8,40E+08	9,60E+08	9,10E+08
34	4,60E+08	4,10E+08	9,10E+08	8,60E+08	7,70E+08	6,40E+08
45	5,40E+08	4,80E+08	9,50E+08	8,70E+08	6,40E+08	5,00E+08
48	5,30E+08	4,80E+08	9,60E+08	8.80E+08	5,60E+08	4,40E+08
52	4,90E+08	4,70E+08	8,90E+08	8,70E+08	6,90E+08	5,90E+08

Temps	CV/ml	VSCA/ml	CV/ml	VSCA/ml	CV/ml	VSCA/ml
	26 g/l	26 g/l	20 g/l	20 g/l	10 g/l	10 g/l
0	8.10E+06	1,00E+00	8.30E+06	1,00E+00	8.00E+06	1,00E+00
3	9,90E+06	1,00E+00	4,70E+07	1,00E+00	8,00E+06	1,00E+00
6	3,00E+07	1,00E+00	6,20E+07	1,00E+00	2,00E+07	1,00E+00
9	9,40E+07	1,00E+00	8,20E+07	1,00E+00	4,80E+07	1,00E+00
12	8,00E+08	1,26E+07	1,20E+08	1,60E+07	9,20E+07	1,60E+07
15	9,60E+08	6,10E+08	2,30E+08	1,40E+08	2,30E+08	1,00E+08
18	1,90E+09	1,50E+09	2,80E+08	2,50E+08	3,70E+08	3,30E+08
21	3,50E+09	3,00E+09	3,40E+08	3,20E+08	4,20E+08	3,20E+08
27	5,00E+09	4,20E+09	6,00E+08	5,40E+08	4,30E+08	3,80E+08
30	4,70E+09	3,60E+09	6,40E+08	6,00E+08	4,30E+08	3,90E+08
34	4,50E+09	3,90E+09	5,40E+08	4,80E+08	4,20E+08	3,50E+08
45	4,60E+09	3,80E+09	5,20E+08	4,00E+08	3,20E+08	3,00E+08
48	3,70E+09	3,50E+09	5,30E+08	4,20E+08	3,30E+08	3,10E+08
52	3,40E+09	3,10E+09	5,80E+08	5,30E+08	2,80E+08	2,30E+08

**Tableau 8.18 :** Comparaison de la croissance de *Bacillus thuringiensis (Bta:* Souche isolée à partir des boues) dans les mixe de CUQ: nombre de cellules en fonctions de la concentration des solides totaux (46 g/Litre, 36 g/Litre, 26 g/Litre, 20g/Litre, 10g/Litre) et du temps

Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
	46 g/l	46 g/l	36 g/l	36 g/l	30 g/l	30 g/l
0	7.30E+05	1,00E+00	6.90E+05	1,00E+00	4,40E+05	1,00E+00
3	8,70E+06	1,00E+00	7,50E+06	1,00E+00	1,20E+07	1,00E+00
6	9,90E+06	1,00E+00	1,26E+07	1,00E+00	1,66E+07	1,00E+00
9	1,80E+07	1,00E+00	2,69E+07	1,00E+00	6,10E+07	1,00E+00
12	2,82E+07	2,00E+07	5,10E+07	6,00E+06	1,05E+08	4,10E+07
15	1,00E+08	9,10E+07	2,14E+08	1,20E+08	3,50E+08	2,14E+08
18	1,70E+08	1,60E+08	4,07E+08	2,82E+08	7,00E+08	5,20E+08
21	4,40E+08	2,30E+08	4,70E+08	4,50E+08	8,00E+08	6,60E+08
27	4,20E+08	4,00E+08	8,70E+08	5,70E+08	1,20E+09	9,10E+08
30	6,50E+08	5,80E+08	1,62E+09	1,50E+09	1,72E+09	1,54E+09
34	5,80E+08	4,60E+08	9,10E+08	7,20E+08	1,26E+09	1,00E+09
45	3,40E+08	3,20E+08	6,40E+08	5,00E+08	1,00E+09	7,10E+08
48	3,70E+08	2,82E+08	5,60E+08	4,40E+08	9,70E+08	6,80E+08
52	3,40E+08	2,14E+08	5,10E+08	4,07E+08	8,90E+08	6,03E+08

Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
	26g/l	26g/l	20g/l	20g/l	10g/l	10g/l
0	7.10E+05	1,00E+00	6.60E+05	1,00E+00	7.00E+05	1,00E+00
3	1,90E+06	1,00E+00	1,95E+06	1,00E+00	9,12E+06	1,00E+00
6	6,30E+07	1,00E+00	5,40E+07	1,00E+00	1,95E+07	1,00E+00
9	1,51E+08	1,00E+00	8,20E+07	1,00E+00	3,39E+07	1,00E+00
12	4,50E+08	7,20E+07	1,58E+08	1,60E+07	6,31E+07	1,60E+07
15	9,60E+08	6,10E+08	3,10E+08	1,40E+08	1,58E+08	7,20E+07
18	1,90E+09	1,50E+09	6,30E+08	2,50E+08	3,40E+08	1,58E+08
21	3,50E+09	3,00E+09	6,00E+08	3,20E+08	4,07E+08	2,14E+08
27	7,70E+09	7.50E+09	6,10E+08	5,40E+08	3,90E+08	3,80E+08
30	7,50E+09	6,60E+09	8,50E+08	8.10E+08	6,20E+08	5.80E+08
34	3,50E+09	2,90E+09	5,75E+08	4,80E+08	4,00E+08	3,90E+08
45	2,69E+09	1,51E+09	4,50E+08	4,00E+08	4,00E+08	3,90E+08
48	2,45E+09	1,26E+09	5,30E+08	4,20E+08	2,24E+08	1,66E+08
52	2,14E+09	1,15E+09	5,80E+08	2,95E+08	1,80E+08	1,58E+08

#### Évolution de O2, de CO2 et du pH (étude réalisée en fermenteur)

**Tableau 8.19 :** Étude de l'évolution de O2, CO2, la concentration de l'oxygène dans les boues de la CUQ avec deux concentrations des solides totaux (26g/Litre) durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 

Temps (h)	pН	O2	CO2	T en °C
0	5,95	5,29	0	31,3
4	6,27	5,32	0,01	31,7
8	6,99	5,49	0,04	30,1
12	7,01	4,82	0,02	31,1
16	7,10	2,46	0,14	31
24	7,28	3,3	0,08	31,9
36	7,29	4,08	0,33	32,2
48	7,17	4,94	0,1	31,4
60	7,44	5,45	0,12	31
72	7,06	5,8	0,03	31,2

**Tableau 8.20:** Étude de l'évolution de O2, CO2, la concentration de l'oxygène dans les boues de la CUQ avec deux concentrations des solides totaux (46g/Litre) durant la fermentation dans les bioréacteurs 15A et 15B : *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 

Temps (h)	pН	O2	CO2	T en °C
0	6,69	5,2	0	31
4	6,97	4,89	0,01	30,8
8	6,93	4,51	0,01	30,9
12	6,87	2,05	0,04	30,8
16	7	0,17	0,08	28,6
24	6,72	2,74	0,14	31,7
36	7,01	3,96	0,21	32,6
48	7,06	4,62	0,17	30,4
60	7,14	5,28	0,15	28
72	7,02	5,76	0,04	32,7

## **Annexe VI**

Influence d'ajout de source additionnelle d'extrait de levure (EL) sur la croissance de *Bta* dans les boues mixtes de la CUQ

**Tableau 8.21 :** Effet de l'ajout de source additionnelle d'EL sur la croissance de *Bta* dans les boues mixtes de la CUO

Temps	<u>0</u> 9	<u></u> g/l	29	g/l	49	g/l
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	5,60E+05	1,00E+00	5,10E+05	1,00E+00	5,20E+05	1,00E+00
3	4,90E+06	1,00E+00	5,90E+06	1,00E+00	8,00E+05	1,00E+00
6	9,90E+06	1,00E+00	6,15E+06	1,00E+00	4,10E+06	1,00E+00
9	2,90E+07	1,00E+00	4,70E+07	1,00E+00	9,60E+07	1,00E+00
12	3,60E+07	2,50E+07	5,60E+07	5,40E+06	2,50E+08	2,10E+08
15	8,70E+07	1,80E+08	9,70E+07	9,50E+08	8,90E+08	8,10E+08
18	4,00E+08	3,30E+08	7,00E+08	5,30E+08	3,95E+09	2,80E+09
21	7,00E+08	6,10E+08	7,80E+08	6,10E+08	4,70E+09	4,20E+09
24	7,50E+08	6,40E+08	8,10E+08	7,40E+08	4,90E+09	4,50E+09
27	5,20E+08	4,70E+08	8,20E+08	7,50E+08	4,80E+09	3,90E+09
30	6,20E+08	4,60E+08	8,40E+08	7,60E+08	3,80E+09	3,60E+09
33	5,80E+08	4,10E+08	8,80E+08	7,60E+08	3,60E+09	2,90E+09
36	5,20E+08	4,50E+08	8,20E+08	7,50E+08	3,70E+09	2,80E+09
48	5,00E+08	3,70E+08	8,00E+08	7,10E+08	3,60E+09	3,30E+09
51	4,70E+08	3,50E+08	8,70E+08	7,50E+08	3,00E+09	2,80E+09
54	4,00E+08	3,60E+08	7,90E+08	7,60E+08	3,10E+09	2,50E+09
57	4,10E+08	3,00E+08	8,10E+08	7,10E+08	3,00E+09	2,40E+09

## Annexe VII Étude de la reproductivité

Tableau 8.22 : Étude de la reproductivité de la production de Bt dans les boues mixtes de la CUQ

Date	06-0	1-99	22-04-99	
, -	CV (UFC/ml)	SPV (UFC/ml)	CV (UFC/ml)	SPV (UFC/ml)
Temps				
0	1,00E+05	1,00E+00	1,50E+05	1,00E+00
3	1,60E+06	1,00E+00	1,90E+06	1,00E+00
6	2,70E+06	1,00E+00	4,50E+07	1,00E+00
9	9,50E+07	2,00E+07	1,07E+08	1,00E+00
12	4,70E+08	3,50E+08	4,06E+08	1,17E+07
15	1,70E+09	1,20E+09	5,90E+08	5,01E+07
18	2,30E+09	1,90E+09	7,59E+08	6,30E+08
21	2,60E+09	1,70E+09	7,94E+08	7,39E+08
27	3,00E+09	2,80E+09	7,70E+08	7,20E+08
30	3,70E+09	3,50E+09	8,00E+08	7,40E+08
34	4,50E+09	4,20E+09	8,50E+08	8,00E+08
45	6,30E+09	6,10E+09	8,70E+08	8,20E+08
48	6,00E+09	5,80E+09	9,70E+08	8,80E+08
52	4,90E+09	4,70E+09	9,40E+08	8,70E+08

Date	14-07	7-99	13-1	0-99
	CV (UFC/ml)	SPV (UFC/ml)	CV (UFC/ml)	SPV (UFC/ml)
Temps		<u> </u>		
0	1,50E+05	1,00E+00	2,70E+05	1,00E+00
3	4,90E+06	1,00E+00	4,90E+06	1,00E+00
6	7,50E+07	1,00E+00	1,03E+07	1,00E+00
9	2,70E+08	1,50E+07	9,40E+07	1,00E+00
12	8,00E+08	7,40E+07	8,00E+08	1,26E+07
15	9,00E+08	6,20E+08	9,60E+08	6,10E+08
18	9,30E+08	8,30E+08	1,90E+09	1,50E+09
21	9,50E+08	9,00E+08	3,50E+09	3,00E+09
27	9,70E+08	9,20E+08	4,20E+09	4,10E+09
30	9,80E+08	9,10E+08	4,50E+09	4,30E+09
34	9,70E+08	9,20E+08	4,90E+09	4,70E+09
45	9,90E+08	9,40E+08	5,70E+09	4,90E+09
48	9,50E+08	9,10E+08	4,60E+09	4,30E+09
52	9,60E+08	9,30E+08	3,40E+09	3,10E+09

## Annexe VIII Étude de l'effet de l'inoculum sur la production de *Bta*

**Tableau 8.23 :** Variation du nombre de cellules et de spores en fonction du temps dans le cas de deux types d'inoculum cas de *Btk* 

	T	TSB		UES
Temps (h)	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	3,50E+05	1,00E+00	3,20E+05	1,00E+00
3	3,80E+05	1,00E+00	9,50E+06	1,00E+00
6	4,00E+06	1,00E+00	8,70E+07	1,00E+00
9	1,51E+07	1,00E+00	7,80E+08	1,20E+06
12	2,09E+08	1,00E+00	8,51E+08	9,20E+07
15	5,70E+08	6,10E+07	1,04E+09	7,50E+08
24	8,80E+08	6,90E+08	1,43E+09	1,30E+09
27	9,10E+08	7,00E+08	1,65E+09	1,50E+09
40	8,80E+08	7,80E+08	1,74E+09	1,70E+09
48	9,10E+08	7,90E+08	1,63E+09	1,51E+09
51	8,70E+08	7,70E+08	1,46E+09	1,30E+09

**Tableau 8.24 :** Variation du nombre de cellules et de spores en fonction du temps dans le cas de deux types d'inoculum cas de *Bta* 

	TSB		ВО	UES
Temps (h)	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	2,82E+05	1,00E+00	3,00E+05	1,00E+00
3 .	4,50E+05	1,00E+00	8,00E+06	1,00E+00
6	2,29E+06	1,00E+00	8,90E+07	1,00E+00
9	1,24E+07	1,00E+00	8,10E+08	1,02E+05
12	3,60E+08	1,00E+00	1,03E+09	6,90E+07
15	5,70E+08	1,30E+08	1,53E+09	4,10E+08
24	9,70E+08	7,50E+08	6,40E+09	6,30E+09
27	2,05E+09	1,70E+09	6,80E+09	6,60E+09
31	3,10E+09	2,78E+09	8,10E+09	7,80E+09
48	3,40E+09	3,10E+09	9,90E+09	9,70E+09
51	3,20E+09	2,90E+09	7,20E+09	7,00E+09

**Tableau 8.25 :** Variation du nombre de cellules et de spores de *Bt* variété *kurstaki* dans les boues mixe de la CUQ en fonction de différent pourcentage d'inoculum 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (v/v)

Temps (h)	1%	1%	2%	2%	3%	3%
Temps (n)	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	4,50E+06	1,00E+00	9,10E+06	1,00E+00	1,40E+07	1,00E+00
3	4,60E+06	1,00E+00	2,09E+07	1,00E+00	6,40E+07	1,00E+00
6	5,20E+07	1,00E+00	8,90E+07	1,00E+00	9,10E+07	1,00E+00
9	1,28E+08	1,00E+00	6,80E+08	1,00E+00	3,50E+08	1,00E+00
12	1,53E+08	8,50E+06	7,90E+08	3,00E+06	1,22E+09	3,00E+08
15	1,74E+08	1,60E+07	8,20E+08	1,70E+08	1,41E+09	3,70E+07
18	1,98E+08	4,60E+07	8,60E+08	7,00E+08	1,55E+09	1,00E+09
21	2,64E+08	1,60E+08	9,20E+08	8,70E+08	1,85E+09	1,70E+09
27	2,51E+08	2,20E+08	1,10E+09	9,80E+08	2,10E+09	1,90E+09
30	2,93E+08	2,50E+08	1,43E+09	1,10E+09	2,30E+09	2,10E+09
34	3,10E+08	2,80E+08	1,85E+09	1,60E+09	2,70E+09	2,49E+09
45	3,40E+08	3,30E+08	2,00E+09	1,90E+09	3,60E+09	2,60E+09
48	3,50E+08	3,40E+08	2,20E+09	2,10E+09	3,40E+09	2,10E+09
52	3,10E+08	3,00E+08	2,10E+09	2,00E+09	3,00E+09	2,00E+09

Temps (h)	4%	4%	5%	5%
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,90E+07	1,00E+00	2,30E+07	1,00E+00
3	2,00E+07	1,00E+00	2,80E+07	1,00E+00
6	9,20E+07	1,00E+00	9,00E+07	1,00E+00
9	2,79E+08	1,00E+00	3,80E+08	1,00E+00
12	3,07E+08	1,26E+07	4,00E+08	3,60E+07
15	3,20E+08	8,80E+07	4,40E+08	7,90E+07
18	4,10E+08	2,80E+08	4,80E+08	2,50E+08
21	4,50E+08	3,00E+08	4,70E+08	3,30E+08
27	4,90E+08	3,80E+08	4,40E+08	3,20E+08
30	5,40E+08	5,10E+08	5,10E+08	4,70E+08
34	5,50E+08	5,30E+08	5,20E+08	4,90E+08
45	6,50E+08	6,20E+08	5,30E+08	5,10E+08
48	6,40E+08	6,20E+08	5,40E+08	5,20E+08
52	6,20E+08	6,10E+08	5,50E+08	5,30E+08

**Tableau 8.26 :** Variation du nombre de cellules et de spores de *Bta* dans les boues mixe de la CUQ en fonction de différent pourcentage d'inoculum 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (v/v)

Temps	1%	1%	2%	2%	3%	3%
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,40E+06	1,00E+00	2,80E+06	1,00E+00	4,20E+06	1,00E+00
3	2,60E+06	1,00E+00	1,30E+07	1,00E+00	2,40E+07	1,00E+00
6	2,00E+07	1,00E+00	7,20E+07	1,00E+00	9,10E+07	1,00E+00
9	2,08E+08	1,00E+00	6,60E+08	1,00E+00	7,50E+08	1,00E+00
12	3,10E+08	8,50E+07	3,30E+09	5,00E+08	2,22E+09	4,00E+08
15	4,70E+08	1,60E+08	4,10E+09	9,70E+08	3,41E+09	3,70E+08
18	6,90E+08	2,96E+08	4,80E+09	3,00E+09	3,60E+08	3,00E+08
21	6,60E+08	5,40E+08	5,90E+09	4,70E+09	4,80E+09	4,20E+09
27	7,50E+08	7,10E+08	7,30E+09	7,00E+09	7,10E+09	6,50E+09
30	7,80E+08	7,50E+08	7,50E+09	7,20E+09	6,30E+09	6,00E+09
34	8,10E+08	7,90E+08	8,60E+09	8,00E+09	6,70E+09	6,10E+09
45	8,40E+08	8,20E+08	8,80E+09	8,20E+09	7,60E+09	7,10E+09
48	8,30E+08	8,10E+08	8,70E+09	8,40E+09	7,40E+09	6,90E+09
52	8,10E+08	7,70E+08	8,10E+09	7,80E+09	7,00E+09	6,30E+09

Temps	4%	4%	5%	5%
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	5,60E+06	1,00E+00	7,00E+06	1,00E+00
3	2,80E+07	1,00E+00	2,00E+07	1,00E+00
6	9,90E+07	1,00E+00	9,20E+07	1,00E+00
9	5,80E+08	1,00E+00	3,08E+08	1,00E+00
12	6,10E+08	9,10E+07	3,11E+08	8,50E+07
15	7,30E+08	7,90E+07	4,70E+08	1,60E+08
18	7,80E+08	9,90E+07	6,90E+08	2,96E+08
21	8,10E+08	7,20E+08	6,60E+08	5,40E+08
27	8,60E+08	7,10E+08	7,50E+08	6,00E+08
30	9,10E+08	7,50E+08	7,80E+08	6,80E+08
34	9,00E+08	7,20E+08	8,10E+08	7,00E+08
45	9,60E+08	8,00E+08	8,40E+08	7,10E+08
48	9,20E+08	7,50E+08	8,30E+08	7,10E+08
52	9,30E+08	7,50E+08	8,10E+08	6,70E+08

## Annexe IX Évolution de la toxicité en fonction du temps

Tableau 8.27a : Étude de l'évolution du potentiel entomotoxique de Btk en fonction du temps

Échantillon	Temps (h)	Toxicité (1)	Toxicité (2)
BK3	9	6854	4250
BK4	12	7530	8505
BK6	15	10920	9810
BK7	21	10980	11025
BK8	24	11960	10765
BK10	30	12390	12430
BK11	33	12350	12351
BK12	36	12210	12360
BK17	51	12100	12280
BK18	54	11600	11580
BK21	57	11400	11680

**Tableau 8.27b :** Étude de l'évolution du potentiel entomotoxique de Btk en fonction du temps : nombre des cellules et des spores en UFC/ml

Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,20E+05	1,00E+00	1,00E+05	1,00E+00
- 3	2,00E+05	1,00E+00	7,10E+05	1,00E+00
6	9,10E+06	1,00E+00	9,90E+06	1,00E+00
9	9,40E+07	1,00E+00	1,70E+07	1,00E+00
12	1,50E+08	1,02E+06	3,50E+07	1,12E+06
15	3,90E+08	3,10E+08	3,70E+08	1,00E+08
18	3,90E+08	2,80E+08	4,00E+08	3,30E+08
21	3,70E+08	2,50E+08	7,00E+08	6,10E+08
24	2,90E+09	2,40E+09	4,00E+09	3,40E+09
27	2,70E+09	2,53E+09	5,20E+09	4,70E+09
30	2,80E+09	2,60E+09	5,00E+09	4,90E+09
33	2,60E+09	2,40E+09	5,50E+09	5,10E+09
36	3,00E+09	2,80E+09	4,00E+09	3,90E+09
51	3,60E+09	3,50E+09	4,30E+09	4,10E+09
54	3,30E+09	3,10E+09	4,40E+09	3,90E+09
57	3,10E+09	2,90E+09	4,90E+09	4,60E+09
60	2,80E+09	2,70E+09	3,80E+09	3,60E+09

Annexe X
Effets de la deuxième inoculation sur la production de *Bta* 

Tableau 8.28a: Effets de la deuxième inoculation sur la production de Bta dans les boues de la CUQ

	CUQM	CUQM	CUQM	CUQM
Temps	1% CV/ml	1% SPV/ml	1+1% CV/ml	1+1% SPV/ml
0	3,40E+06	1,00E+00	3,90E+06	1,00E+00
3	3,80E+06	1,00E+00	1,35E+07	1,00E+00
6	5,70E+07	1,00E+00	1,74E+08	1,00E+00
9	4,60E+08	1,00E+00	5,50E+08	1,00E+00
12	1,07E+09	1,50E+07	6,10E+08	1,50E+07
15	1,47E+09	4,30E+08	7,41E+08	4,30E+08
18	2,86E+09	2,70E+09	1,45E+09	1,00E+09
21	3,00E+09	2,90E+09	4,47E+09	1,10E+09
24	2,27E+09	2,16E+09	8,91E+09	5,90E+09
27	2,80E+09	2,55E+09	2,04E+10	8,30E+09
30	3,16E+09	3,00E+09	3,70E+10	1,74E+10
33	3,50E+09	3,30E+09	9,20E+10	2,06E+10
36	4,10E+09	4,00E+09	1,07E+11	9,70E+10
48	4,00E+09	3,90E+09	1,30E+11	1.20E+11
52	4,40E+09	4,10E+09	1,10E+11	1.07E+11
56	4,30E+09	4,00E+09	1,28E+10	1,23E+11
72	4,10E+09	3,90E+09	1,23E+10	1,14E+09

Tableau 8.28b: Effets de la deuxième inoculation sur la production de Bta dans l'amidon

	Amidon	Amidon	Amidon	Amidon
Temps	1+1% CV/ml	1+1% SPV/ml	1% CV/ml	1% SPV/ml
0	4,20E+06	1,00E+00	4,10E+06	1,00E+00
3	2,80E+07	1,00E+00	3,60E+07	1,00E+00
6	1,23E+08	1,00E+00	2,40E+08	1,00E+00
9	1,99E+09	1,00E+00	1,00E+09	1,00E+00
12	7,10E+09	1,10E+09	6,20E+09	4,90E+07
15	2,20E+10	1,40E+10	8,00E+09	2,90E+08
18	4,50E+10	2,60E+10	9,00E+09	7,00E+09
24	8,60E+10	5,00E+10	1,09E+10	9,60E+09
27	9,80E+10	7,80E+10	1,30E+10	1,25E+09
30	2,32E+11	1,80E+11	1,50E+10	1,30E+10
33	9,50E+11	8,70E+11	1,70E+10	1,50E+10
36	9,90E+11	9,50E+11	2,00E+10	1,80E+10
48	1,00E+12	9,80 <b>E</b> +11	2,40E+10	2,30E+10
52	1,20E+12	1,10E+12	2,20E+10	2,16E+10
56	1,10E+12	1,07E+12	2,30E+10	2,11E+10
72	1,10E+12	1,06E+12	2,15E+10	2,10E+10

**Annexe X-1** 

Tableau 8.29 : Étude de la deuxième inoculation dans le surnageant des boues et du milieu soya

	Boue 1%+1%	boue1%+1%	Surnageant de	Surnageant de
Temps (h)			boue 1%	boue 1%
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	3,70E+05			
3	3,70E+06			
6	1,20E+07			
9	1,90E+08			
12	1,80E+09	9,80E+07		
15	1,29E+10	9,30E+09		
24	3,50E+10	2,21E+10	4,20E+05	
28	5,90E+10	4,80E+10	1,00E+06	
32	1,95E+11	1,70E+11	8,09E+06	
.36	9,90E+11	9,17E+11	1,09E+07	
40	1,09E+12	1,05E+12	1,00E+07	4,27E+06
44	1,41E+12	1,13E+12	1,62E+07	7,94E+06
48	1,21E+12	1,11E+12	2,40E+07	2,00E+07
52	1,30E+12	1,11E+12	4,30E+07	2,95E+07
56	1,10E+12	1,03E+12	4,10E+07	3,50E+07
60	1,20E+12	1,12E+12	3,90E+07	3,60E+07
64	1,13E+12	1,11E+12	4,10E+07	3,10E+07
68	1,22E+12	1,13E+12	4,01E+07	3,70E+07
72	1,15E+12	1,05E+12	4,20E+07	4,00E+07
76			4,10E+07	3,90E+07

(Suite)

Temps				
h	Soya 1%+1%)	Soya 1%+1%	Surnageant soya 1%	Surnageant soya 1%
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	4,20E+05			
3	2,45E+06			
6	9,70E+07			
9	2,24E+08			
12	9,00E+08	5,30E+07		
15	1,50E+09	9,30E+08		
24	5,50E+09	4,80E+09	5,00E+05	
28	2,60E+10	2,07E+10	2,57E+05	
32	7,20E+10	6,20E+10	1,07E+06	
36	1,41E+11	1,30E+11	1,82E+06	
40	2,00E+11	1,70E+11	5,80E+06	1,55E+06
44	2,86E+11	2,00E+11	5,90E+06	4,00E+06
48	2,90E+11	2,00E+11	6,20E+06	4,10E+06
52	2,41E+11	1,97E+11	7,50E+06	7,00E+06
56	2,00E+11	1,90E+11	7,40E+06	7,00E+06
60	2,30E+11	2,00E+11	6,70E+06	6,01E+06
64	1,90E+11	1,80E+11	6,80E+06	6,20E+06
68	2,10E+11	2,00E+11	7,50E+06	6,70E+06
72	2,00E+11	1,90E+11	6,90E+06	6,30E+06

Étude de la deuxième inoculation dans le surnageant des boues et du milieu soya (Suite)

Temps				-	
(h)	Boue	es 2%	Soya 2%		
	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	
0	3,90E+05		4,50E+05		
3	2,80E+06		2,30E+06		
6	1,20E+07		3,70E+07		
9	5,70E+08		4,40E+07		
12	8,60E+08	1,30E+07	1,90E+08	1,70E+07	
15	1,00E+09	1,40E+09	8,90E+08	5,10E+08	
24	1,78E+09	1,60E+09	1,31E+09	1,15E+09	
28	1,60E+09	1,40E+09	1,80E+09	1,50E+09	
32	3,70E+09	3,30E+09	5,01E+09	4,00E+09	
36	4,50E+09	4,30E+09	5,60E+09	5,30E+09	
40	5,40E+09	5,10E+09	6,20E+09	5,80E+09	
44	6,90E+09	6,70E+09	6,10E+09	5,70E+09	
48	7,50E+09	7,30E+09	5,90E+09	5,80E+09	
52	6,90E+09	6,50E+09	5,50E+09	5,30E+09	

## **Annexe X-2**

Étude de l'effet du temps de fermentation, du pourcentage d'inoculum, de la concentration des solides totaux dans les boues et du traitement des boues sur la deuxième inoculation

Tableau 8.30 : Étude de L'effet de différent pourcentage d'inoculum dans le cas d'une deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de Btk dans les boues de la CUQ

	1%	<b>6</b>	1,5	0%	2%	/ <sub>0</sub>	36	%
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	4,80E+05		7,30E+05	-	9,50E+05		1,60E+06	
3	5,80E+06		5,00E+06		2,00E+07		4,00E+07	
6	4,40E+07		5,40E+07		1,60E+08		2,10E+08	
9	2,75E+08		2,80E+08		5,10E+08		9,90E+08	
12	4,70E+08	1,80E+08	4,07E+08	3,00E+08	1,23E+09	7,50E+08	1,74E+09	2,50E+08
16	1,70E+09	9,30E+08	7,40E+08	6,50E+08	3,20E+09	2,57E+09	6,00E+09	4,60E+09
24	1,00E+10	5,60E+09	9,00E+09	7,30E+09	1,91E+10	1,23E+10	1,10E+10	9,00E+09
27	2,34E+10	8,50E+09	3,09E+10	2,90E+10	1,82E+10	1,51E+10	1,30E+10	9,10E+09
30	7,90E+10	7,35E+10	6,00E+10	5,50E+10	2,40E+10	2,14E+10	1,90E+10	9,20E+09
33	8,50E+10	8,00E+10	2,60E+11	2,40E+11	2,50E+10	2,21E+10	2,50E+10	9,90E+09
36	2,00E+11	1,90E+11	9,30E+11	9,00E+11	,	2,47E+10	•	1,10E+10
40	1,05E+12	9,80E+11	2,80E+12	2,50E+12	,	1,90E+10		1,80E+10
44	1,95E+12	1,50E+12	6,17E+12	5,8E+12	,	2,40E+10	*	1,90E+10
48	3,20E+12	2,40E+12	8,80E+12	8,40E+12	,	2,50E+10		3,10E+10
52	3,90E+12	2,50E+12	7,90E+12	7,70E+12	2,50E+10	2,36E+10	3,00E+1	2,90E+10

**Tableau 8.31 :** Effet du temps de la deuxième inoculation sur la croissance et l'entomotoxicité de *Btk* obtenu dans les boues de la CUQ

	2	%	1%+1	% 15h	1%+1	% 24h
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	3,30E+06	1,00E+00	1,60E+06	1,00E+00	1,40E+06	1,00E+00
3	9,80E+06	1,00E+00	4,40E+06	1,00E+00	4,40E+06	1,00E+00
6	7,80E+07	1,00E+00	7,60E+07	1,00E+00	1,35E+07	1,00E+00
9	9,90E+08	1,00E+00	5,50E+08	1,00E+00	9,60E+08	1,00E+00
12	1,00E+09	2,00E+07	6,30E+08	2,00E+07	9,80E+08	9,00E+07
15	4,10E+09	5,00E+08	1,51E+09	2,57E+08	1,00E+09	2,57E+08
18	7,80E+09	1,10E+09	2,24E+09	6,00E+08	1,82E+09	1,00E+09
24	9,20E+09	4,90E+09	2,29E+10	1,95E+10	7,90E+09	7,30E+09
28	1,10E+10	9,70E+09	8,00E+10	7,00E+10	2,75E+10	2,10E+10
31	1,20E+10	1,00E+10	2,70E+11	2,30E+11	9,50E+10	8,20E+10
34	1,50E+10	1,20E+10	9,10E+11	8,50E+11	2,95E+11	2,70E+11
36	1,70E+10	1,50E+10	1,26E+12	1,20E+12	5,40E+11	4,90E+11
39	2,60E+10	2,01E+10	2,51E+12	2,40E+12	2,10E+12	2,00E+12
42	2,30E+10	2,10E+10	2,63E+12	2,40E+12	2,30E+12	2,10E+12
45	2,50E+10	2,00E+10	3,10E+12	2,90E+12	2,50E+12	2,10E+12
48	2,40E+10	2,00E+10	3,10E+12	3,00E+12	2,60E+12	2,10E+12
53	2,60E+10	2,10E+10	3,00E+12	2,90E+12	2,40E+12	2,00E+12
58	1,90E+10	1,80E+10	2,70E+12	2,60E+12	2,50E+12	2,10E+12
72	2,00E+10	1,90E+10	2,60E+12	2,40E+12	2,10E+12	1,90E+12

(Suite)

	1%+1% 36h		1%+1	% 48h
Temps				
(h)	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,80E+06	1,00E+00	1,60E+06	1,00E+00
3	3,50E+06	1,00E+00	2,21E+06	1,00E+00
6	4,90+07	1,00E+00	8,00E+07	1,00E+00
9	6,34E+08	1,00E+00	3,90E+08	1,00E+00
12	7,08E+08	2,00E+08	4,50E+08	8,00E+07
15	7,76E+08	3,90E+08	6,10E+08	2,57E+08
18	2,88E+09	1,50E+09	1,20E+09	6,00E+08
24	5,75E+09	5,10E+09	4,30E+09	1,25E+09
28	9,40E+09	9,10E+09	6,50E+09	4,70E+09
31	9,50E+09	9,30E+09	8,40E+09	8,10E+09
34	9,70E+09	9,20E+09	9,60E+09	8,70E+09
36	9,70E+09	9,20E+09	1,10E+10	8,11E+09
39	1,70E+10	1,32E+10	1,12E+10	9,10E+09
42	5,80E+10	5,50E+10	1,17E+10	9,10E+09
45	2,00E+11	1,90E+11	1,12E+10	9,00E+09
48	3,62E+11	3,30E+11	1,21E+10	1,10E+10
53	5,80E+11	5,20E+11	3,90E+10	3,80E+10
58	8,90E+11	7,50E+11	2,52E+11	2,40E+11
72	8,80E+11	7,40E+11	2,56E+11	2,35E+11

Tableau 8.32: Étude de l'effet de la concentration des solides totaux dans les boues sur la deuxième inoculation

	25g/l		35	35g/1		g/l
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,37E+05		1,18E+05		1,50E+05	1,00E+00
3	1,00E+06		9,70E+06		1,90E+06	1,00E+00
6	1,48E+07		2,51E+07		6,80E+07	1,00E+00
9	9,90E+07		9,90E+07		7,10E+07	1,00E+00
12	1,78E+08	1,80E+07	7,70E+08	1,80E+08	8,38E+08	2,00E+08
18	5,50E+08	2,09E+08	2,04E+09	9,90E+08	2,70E+09	1,50E+09
24	1,00E+09	5,60E+08	7,24E+09	4,57E+09	4,89E+09	2,88E+09
27	6,34E+09	4,80E+09	6,34E+10	5,50E+10	3,30E+10	2,90E+10
30	9,90E+09	9,30E+09	9,00E+10	8,10E+10	9,50E+10	8,10E+10
33	1,65E+10	1,50E+10	6,50E+11	6,00E+11	1,23E+11	1,19E+11
36	9,80E+10	9,01E+10	9,00E+11	8,60E+11	6,10E+11	6,00E+11
40	6,20E+11	6,00E+11	3,20E+12	3,00E+12	8,50E+11	8,30E+11
44	7,40E+11	7,10E+11	3,90E+12	3,70E+12	8,10E+11	7,70E+11
48	7,80E+11	7,60E+11	3,70E+12	3,50E+12	8,20E+11	7,90E+11
52	6,90E+11	6,40E+11	3,80E+12	3,40E+12	8,50E+11	8,30E+11

Tableau 8.33: Étude de l'effet de la pré-hydrolyse des boues par des enzymes sur la deuxième inoculation

	Boue 1%		Bou	e1+1%
Temps				
(h)	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,11E+06		1,20E+06	
3	2,80E+06		1,20E+07	
6	3,10E+07		4,17E+07	
9	6,50E+07	•	9,30E+07	
12	1,51E+08 6	5,50E+07	1,32E+08	5,13E+07
15	2,45E+08	1,45E+08	2,04E+08	1,20E+08
18	4,40E+08	2,69E+08	3,72E+08	1,86E+08
21	7,41E+08	3,80E+08	6,46E+08	2,82E+08
24	1,48E+09	7,41E+08	2,90E+09	2,75E+09
28	1,91E+09	1,82E+09	3,50E+09	3,30E+09
32	3,40E+09	3,30E+09	2,80E+10	2,70E+10
36	3,00E+09 2	2,80E+09	5,89E+10	5,20E+10
40	3,51E+09	3,20E+09	1,90E+11	1,05E+11
44	3,60E+09	3,40E+09	4,20E+11	3,50E+11
48	4,00E+09	3,50E+09	7,50E+11	6,90E+11
52	3,10E+09	3,00E+09	6,90E+11	6,60E+11
56	3,92E+09	3,50E+09	7,10E+11	7,00E+11

#### (Suite)

	Boue hydrolysée a	vec enzyme 1%	Boue hydrolysée	avec enzyme1+1%
Temps	CV/ml	SPV/ml	CV/ml	SPV/ml
0	1,40E+06		1,20E+06	
3	3,00E+06		3,50E+06	
6	7,20E+07		9,17E+07	
9	5,90E+08		2,95E+08	
12	7,70E+08	3,40E+08	7,76E+08	3,39E+08
15	2,57E+09	1,62E+09	2,50E+09	1,62E+09
18	3,90E+09	3,6.E+09	1,98E+10	1,63E+10
21	8,10E+09	6,40E+09	2,13E+10	2,05E+10
24	1,23E+10	1,00E+10	3,23E+10	3,00E+10
28	1,45E+10	1,66E+10	1,45E+11	1,36E+11
32	1,80E+10	1,70E+10	2,80E+11	2,70E+11
36	2,40E+10	2,30E+10	7,40E+11	7,20E+11
40	2,69E+10	2,65E+10	9,69E+11	9,45E+11
44	2,80E+10	2,58E+10	3,16E+12	3,00E+12
48	2,57E+10	2,51E+10	6,40E+12	6,30E+12
52	2,40E+10	2,09E+10	6,30E+12	6,00E+12
56	2,50E+10	2,40E+10	6,20E+12	6,10E+12

# Annexe X-3 Étude de l'activité protéolytique

Tableau 8.34 : Densité optique dans le cas de la courbe standard

Tyrosine (μM)	Densité Optique
	moyenne
	(D.O)
0	0
50	0.043
100	0.141
250	0.324
500	0.629
1000	1.343

Tableau 8.35: Activité protéolytique dans le cas des deux types d'inoculation

	boue de la CUQ 1% +1%			Boue de la CUQ 2%		
Temps (h)	Do	Tyrosine	AP	DO	Tyrosine	AP
0	0,061	55,4615385	0,06100769	0,041	40,0769231	0,04408462
3	1,317	1021,61538	1,12377692	0,53	416,230769	0,45785385
9	1,821	1409,30769	1,55023846	1,871	1447,76923	1,59254615
24	1,516	1174,69231	1,29216154	1,89	1462,38462	1,60862308
32	1,656	1282,38462	1,41062308	1,738	1345,46154	1,48000769
48	2,312	1787,32911	1,96570000	1,1225	872,15260	0,9592000
56	1,297	1006,23077	1,10685385	1,555	1204,69231	1,32516154
60	1,36	1054,69231	1,16016154	1,609	1246,23077	1,37085385

**Tableau 8.36 :** Activité protéolytique dans le cas des deux types d'inoculation : comparaison du milieu soya et des boues

Temps (h)	A P/Soya1%+1 %	A P/Soya2%	A P/Boue CUQ/1%+1%	A P/Boue CUQ/2%
24	0,0762	0,0861	0,0605	0,0390
48	3 0,5492	0,5965	0,6934	0,6050
72	0,4940	0,6192	0,6059	0,6630

Tableau 8.37 : Nombre de cellules et de spores dans le cas de l'étude des protéases

Temps	VC (Soya)2%	SPV(Soya)2%	VC(Soya)1%+1%	SPV(Soya)1%+1%
0	2,00E+06	1,00E+00	1,10E+06	1,00E+00
3	3,10E+07	1,00E+00	3,60E+07	1,00E+00
6	5,50E+07	1,00E+00	5,40E+08	1,00E+00
9	7,70E+07	1,00E+00	4,00E+09	2,00E+06
12	1,84E+08	1,50E+06	5,20E+09	4,90E+07
15	4,90E+08	7,90E+07	5,90E+09	4,90E+08
24	2,30E+08	2,20E+08	2,90E+10	1,40E+10
27	5,20E+08	4,60E+08	3,30E+10	2,50E+10
30	1,20E+09	1,10E+09	4,50E+10	4,30E+10
33	2,50E+09	2,30E+09	3,30E+10	3,00E+10
36	3,90E+09	3,70E+09	3,70E+10	3,60E+10
48	3,80E+09	3,70E+09	3,40E+10	3,30E+10

Temps	VC (Boues) 2%	SPV(Boues) 2%	VC(Boues)1%+ 1%	SPV(Boues)1%+ 1%
0	2,10E+06	1,00E+00	1,20E+06	1,00E+00
3	1,80E+07	1,00E+00	2,80E+07	1,00E+00
6	6,70E+07	1,00E+00	1,23E+08	1,00E+00
9	3,00E+08	1,10E+07	1,99E+09	1,00E+07
12	5,40E+08	5,20E+07	3,10E+09	2,10E+09
15	1,07E+09	9,90E+08	6,20E+09	6,00E+09
24	4,20E+09	3,80E+09	4,50E+10	3,60E+10
27	6,30E+09	6,10E+09	6,80E+10	6,50E+10
30	7,70E+09	7,40E+09	7,30E+10	6,90E+10
33	7,90E+09	7,50E+09	2,50E+11	2,40E+11
36	6,70E+09	6,50E+09	2,70E+11	2,56E+11
48	7,00E+09	6,70E+09	2,60E+11	2,47E+11

## **Annexe X-4**

## Application de la deuxième inoculation dans les bioréacteurs 15A, 15B en utilisant les boues secondaires de la CUQ

**Tableau 8.38 :** Résultat de l'application de la deuxième inoculation dans les bioréacteurs 15A, 15B en utilisant les boues secondaires de la CUQ

	15A		15B	
Temps (h)	2%(cellules)	2%(spores)	Double inoculation 1%(cellules)	Double inoculation 1%(spores)
0	3,90E+05		1,90E+05	
3	1,29E+06		3,90E+06	
6	7,90E+06		1,20E+07	
9	9,70E+07		9,20E+07	
12	6,10E+08	1,39E+08	3,30E+08	2,80E+08
15	3,00E+09	2,51E+09	1,12E+09	1,00E+09
24	4,00E+09	3,34E+09	2,45E+10	8,10E+09
27	3,40E+09	3,20E+09	6,40E+10	2,45E+10
30	4,30E+09	4,12E+09	2,50E+11	1,29E+11
33	5,00E+09	4,81E+09	3,10E+11	1,35E+11
36	5,50E+09	5,30E+09	3,30E+11	1,51E+11
48	5,30E+09	5,20E+09	3,40E+11	2,09E+11
51	5,40E+09	5,10E+09	3,50E+11	2,24E+11
54	5,80E+09	5,60E+09	3,10E+11	2,24E+11
57	5,60E+09	5,48E+09	3,80E+11	3,74E+11

Tableau 8.39 : Étude de l'évolution de l'oxygène et du pH dans le cas de la deuxième inoculation

Tomme (b)	2% une seule inoculation O2	double inoculation de 1%	2% une seule inoculation PH	double inoculation de 1%
Temps (h)		O2		pН
0	7,70	7,60	7,51	7,57
3	5,20	6,2	6,26	6,17
6	3,56	5,34	6,13	7,44
9	2,47	4,56	6,77	7,72
12	2,31	4,53	7,31	6,83
15	5,91	6,31	7,72	6,87
18	7,84	5,66	7,66	7,30
21	8,25	5,20	7,7	7,56
24	8,49	6,00	7,76	7,90
27	8,84	6,51	7,79	7,98
30	8,87	6,91	7,86	8,05
33	8,65	7,16	8,00	8,07
36	8,47	7,10	8,10	8,50
48	8,11	6,95	8,15	8,15

Tableau 8.40: Étude de l'évolution de la concentration du carbone dans le cas de la deuxième inoculation

Temps (h)	C1%	N1%	C1%/N1%	C2%	N2%	C2%/N2%
0	36,081	2,114	17,0676443	36,081	2,114	17,0676443
3	36,018	2,124	16,9576271	35,898	2,174	16,5124195
6	36,037	1,861	19,3643203	34,743	2,153	16,1370181
9	35,693	1,93	18,4937824	34,097	1,64	20,7908537
12	35,352	2,222	15,909991	34,066	1,917	17,7704747
24	34,8	2,162	16,0962072	34,765	2,56	13,5800781
27	34,519	2,46	14,0321138	34,099	2,091	16,3075084
30	33,739	1,855	18,1881402	33,946	2,282	14,8755478
33	33,516	1,606	20,8692403	33,879	1,931	17,5447954
48	33,364	2,086	15,9942474	32,875	2,148	15,3049348
51	33,309	2,036	16,3600196	32,665	2,331	14,013299
54	32,95	2	16,475	32,486	2,263	14,3552806
57	32,08	1,904	16,8487395	31,791	2,557	12,4329292

Tableau 8.41 : Étude de l'évolution des solides totaux dans les boues secondaires au cours de la fermentation de Bt avec deux inoculations.

Temps	ST (g/l) (2%)	ST (g/l) (1%+1%)
0	30,32	30,4
6	30,8	29,7
9	30,68	29,27
15	30,14	29
24	29,8	27,8
27	29,9	27,7
33	29,6	27,6
41	28,6	26,1
48	28,3	25,4
51	27,70	25,1

## Annexe XI Étude statistique

Tableau 8.42 : Étude statistique de la comparaison des deux souches Bta et Btk

	Cellules UFC/ml	Spores	Toxicité	pH final
		UFC/ml	UI/µl	. •
SA1*	$4.9x10^{10}$	$3.5x10^9$	9580	7.49
SK1	$1.2x10^9$	$1.1 \times 10^9$	7620	7.48
BA1	$1.0x10^{10}$	$9.1 \times 10^9$	10680	7.80
BK1	$6.0x10^9$	$6x10^{9}$	5990	8.12
SA2	3.3x10 <sup>9</sup>	$3.0 \text{x} 10^9$	9510	7.30
SK2	$1.05 \text{x} 10^{10}$	$1x10^{10}$	7270	7.39
BA2	$9.2x10^9$	$9.0x10^9$	11170	7.55
BK2	4.6x10 <sup>9</sup>	$1.03 \times 10^{10}$	9048	7.71
SA3	$1.1 \text{x} 10^8$	$9x10^{7}$	10060	7.32
SK3	$3.4x10^7$	$3.0x10^{7}$	9360	7.41
BA3	$1.2x10^8$	$9.1x10^{7}$	12520	7.69
BK3	$1.2x10^8$	$1.2x10^{8}$	8530	7.70
SA4	$7.1 \times 10^7$	$6.5 \text{x} 10^7$	9400	7.21
SK4	$8.0x10^7$	$7.9x10^{7}$	12060	7.29
BA4	$5.4x10^8$	$4.8 \times 10^{8}$	10190	7.50
BK4	$1.2x10^8$	$1.0 \times 10^8$	8580	7.69
SA5	$5.7x10^8$	$4.6 \times 10^8$	10560	7.19
SK5	$8.3x10^8$	$4.8 \times 10^{10}$	8640	7.12
BA5	$2.8x10^9$	$6x10^{8}$	11610	7.60
BK5	$3.0 \text{x} 10^8$	$9x10^{7}$	7100	7.90
SA6	7.1x10 <sup>9</sup>	$6.8 \text{x} 10^9$	10540	7.03
SK6	$8.9x10^9$	$9.1 \times 10^{8}$	8350	7.08
BA6	$1.1 \text{x} 10^{10}$	$1.8 \times 10^{10}$	11210	7.50
BK6	9.9x10 <sup>9</sup>	$8.3x10^9$	10060	7.80
SA7	5x10 <sup>8</sup>	$5x10^{8}$	11048	7.39
SK7	$7x10^{8}$	$3x10^{8}$	10369	7.37
BA7	$1.6 \times 10^9$	$1.010^{9}$	11580	7.90
BK7	$2.3x10^9$	1.7x10 <sup>9</sup>	7590	8.10
SA8.	9x10 <sup>8</sup>	$8.7 \times 10^{8}$	10410	7.70
SK8	$7.5 \times 10^{8}$	$7.1 \times 10^{8}$	13100	7.90
BA8	$2.9 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^{10}$	11240	7.55
BK8	3.2x10 <sup>9</sup>	1.04x10 <sup>9</sup>	9586	7.61
SA9	9.2x10 <sup>9</sup>	$8.7 \times 10^9$	9910	7.20
SK9	$8.7 \times 10^9$	$6.2 \times 10^9$	7910	7.50
BA9	$4.4 \times 10^{10}$	$3.5 \times 10^{10}$	10989	7.51
BK9	$9.7x10^9$	9.6x10 <sup>9</sup>	7960	7.80

Tableau 8.43 : Étude statistique de la comparaison des deux types d'inoculum 1%+1% et 2%

	Cellules UFC/ml	Spores	Toxicité	PH final
	Centres of C/IIII	UFC/ml	UI/µl	111 111141
S1%1	1.21x10 <sup>11</sup>	1.1x10 <sup>11</sup>	13230	7.7
S2%1	$4.4 \times 10^{10}$	$3.6 \times 10^{10}$	12510	7.9
B1%1	1.12X10 <sup>12</sup>	$1.8 \times 10^{12}$	14595	8.08
B2%1	1.09X10 <sup>9</sup>	$1.1 \times 10^9$	11375	8.19
S1%2	1.8x10 <sup>10</sup>	$1.7 \times 10^{10}$	12800	8.07
S2%2	8.0X10 <sup>9</sup>	$6.0 \text{X} 10^9$	11170	7.68
B1%2	$4.7X10^{12}$	$1.5X10^{12}$	14250	8.32
B2%2	$4X10^{10}$	$3.3 X 10^{10}$	12705	8.25
S1%3	9.7X10 <sup>9</sup>	$1.10 \mathrm{X} 10^{10}$	12442	7.57
S2%3	1.7X10 <sup>9</sup>	$9.7 \mathrm{X} 10^8$	8129	8.23
B1%3	2X10 <sup>11</sup>	$1.9 \text{x} 10^{11}$	13279	8.38
B2%3	2.6X10 <sup>9</sup>	$2X10^{9}$	10019	8.35
S1%4	9X10 <sup>10</sup>	$7.5X10^{10}$	13779	8.26
S2%4	8.9X10 <sup>9</sup>	$8.2X10^{9}$	12009	8.25
B1%4	2.0X10 <sup>11</sup>	$9.2X10^{10}$	15309	8.28
B2%4	2.1X10 <sup>9</sup>	$2.1X10^{9}$	11949	8.30
S1%5	1.7X10 <sup>10</sup>	$1.1 \text{X} 10^{10}$	12909	6.8
S2%5	5.8X10 <sup>9</sup>	$3.9\mathrm{X}10^9$	10509	6.4
B1%5	1.7X10 <sup>11</sup>	$1.5X10^{11}$	13991	7.60
B2%5	3.0X10 <sup>9</sup>	$2.0 \text{X} 10^9$	10659	7.8
S1%6	1.6X10 <sup>10</sup>	1.5X10 <sup>10</sup>	12749	7.73
S2%6	5.8X10 <sup>9</sup>	$5.4 \times 10^9$	11929	7.77
B1%6	$1.1X10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	14649	7.86
B2%6	3.2X10 <sup>9</sup>	3.3X10 <sup>9</sup>	12100	7.93
S1%7	$1.6 \times 10^{10}$	1.5x10 <sup>10</sup>	13180	8.29
S2%7	$9.2 \times 10^{8}$	$9.4 \times 10^{8}$	10530	8.73
B1%7	7.5X10 <sup>12</sup>	$5.6 \times 10^{12}$	15151	8.40
B2%7	1.6X10 <sup>10</sup>	1.8X10 <sup>10</sup>	12825	8.22
S1%8	2.5X10 <sup>10</sup>	1.5X10 <sup>10</sup>	12870	7.79
S2%8	1.7X10 <sup>9</sup>	1.5X10 <sup>9</sup>	12100	8.50
B1%8	1.7X10 <sup>11</sup>	1.5X10 <sup>11</sup>	14560	8.37
B2%8	1.6X10 <sup>9</sup>	1.3X10 <sup>9</sup>	12410	8.39
S1%9	2.1X10 <sup>10</sup>	2.0X10 <sup>10</sup>	13100	8.06
S2%9	5.3X10 <sup>9</sup>	4.8X10 <sup>9</sup>	12600	8.33
B1%9	$2.0 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	15320	8.38
B2%9	5.9X10 <sup>9</sup>	2.8X10 <sup>9</sup>	12710	8.36

<sup>\*</sup> Les numéros de 1 à 9 représente le numéro de l'expérience \* Les lettres S, B signifient respectivement : S soya; B Boues,

Tableau 8.44 : Composition de l'enzyme KamiZym-D (Dr Valéro, Forêt Canada)

Produits	Quantités
Amylase	4200 DU
Glucoamylase (maltase)	6 AG
Alpha-galactosidase	25 AGSU
Invertase (sucrose)	160 SU
Lactase	200 LacU
Cellulase	225 CU
Protéase	8800 HU ou 7750 HUT
Peptidase (protéase acide stable)	24 SAPU ou U
Broméline	19.2 GDU ou 29 MCU
Lipase (acide stable)	96 LU
Coriande, Guimauve, Gratteron, Mélisse,	
Romarin	

Tableau 8.45 : Composition de la diète artificielle sans Agar

Composants	Quantités
Eau distillée	1000 ml
aséine (sans vitamine)	35 g
Hydroxyde de potassium 4M	5 g
Alphacel	5 g
Mélange de sels Wesson (salt mixture Wesson)	10 g
Chlorure de choline	44 g
Solution de vitamines	0.8 ml
Acide ascorbique	4 g
Formaldéhyde 40%	2 ml
Méthyl-p-hydroxybenzoate	1.5 ml
Sucrose	35 g
Bouillon nutritif	10.3 g
Acide Ascorbique	1.5 g
Solution de vitamines	
Eau distillée	100 ml
Niacine	100 ml
Pantothénate de calcium	100 ml
Riboflavine	50 mg
Hydrochlorure de thiamine	25 mg
Hydrocholorure de pyridoxine	25 mg
Acide folique	25 mg
Biotine	2 mg
Vitamine B12	0.2 mg

Tableau 8.46: Les  $\delta$ -endotoxines de Bacillus thuringiensis (Lereclus et al., 1989)

Protoxine	δ-endotoxine	Gène	Insectes cible
Cristal bipyramidal	130 à 138 Kd	Cry I A (a, b, c)	Lépidoptères
	138 Kd	Cry IB	Lépidoptères
	135 Kd	Cry IC	Lépidoptères
	130-134 Kd	Cry ID, E, F,	Lépidoptères
Cristal cuboïde	71 Kd	cry II A	Lépidoptères/ Diptères
	71 Kd	cry II B	Lépidoptères
	70 Kd	cry II C	Lépidoptères
Cristal allongé	73 Kd	cry III A	Coléoptères
parallélépipédique	74	cry III B	Coléoptères
	129	cry III C	Coléoptères
	73	cry III D	Coléoptères
	128 à 134 Kd	cry IV A et B	Diptères
	78 <b>K</b> d	cry IV C	-
	72 Kd	cry IV D	
	81	Cry VA	Lépidoptères/Coléoptères