

Université du Québec

Institut national de la recherche scientifique

Eau, Terre et Environnement

**CONCEPTION D'UNE STRATEGIE DE PRODUCTION  
OPERATIONNELLE DE BIOPESTICIDE A BASE DE *BACILLUS*  
*THURINGIENSIS* UTILISANT LES BOUES D'EPURATION COMME  
SUBSTRAT DE FERMENTATION**

Par

Abdessalem Yezza

Thèse présentée

Pour l'obtention du grade de Doctorat ès sciences (D.Sc.) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examinateur externe

Raynald Laprade (Université de Montréal)

Examinateur externe

Denis Groleau (Institut recherche en biotechnologie)

Examinateur interne

Jean-Louis Sasseville (INRS-ETE)

Codirecteur de recherche

José R. Valéro, Centre foresterie des Laurentides

Directeur de recherche

Rajeshwar D. Tyagi (INRS-ETE)



## DÉDICACE

*À MES PARENTS, AURÉLIE, MA SŒUR, MES FRÈRES, MES ONCLE ET  
TANTES ET TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS ET QUI SE RECONNAÎTRONT*



## **REMERCIEMENTS**

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en reconnaissance à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Je suis heureux d'exprimer toute ma gratitude envers Professeur R.D. Tyagi, qui m'a fait confiance en me proposant ce sujet de thèse. Son extrême compétence, doublée d'une grande exigence, m'ont permis de pénétrer un domaine de recherche passionnant. Je remercie également Docteur J.R Valéro, qui a co-encadré ce travail, pour ces précieux conseils et sa disponibilité tout au long de cette recherche.

Mes remerciements vont ensuite au Dr Jean-Louis Sasseville, Professeur honoraire à l'INRS-ETE, pour son aide précieuse et ses judicieux conseils et commentaires.

J'exprime mes vives reconnaissances à mes collègues de laboratoire, Simon Barnabé, Yan Song, Marie-Ève LeBlanc et Mathieu Drouin, la technicienne Pauline Fournier, les secrétaires Suzanne Dussault et Johanne Desrosiers pour leur aide si précieuse et pour s'être montrés aussi serviable à mon égard.

Avant de terminer, il me faut exprimer ici ma gratitude à ma compagne Aurélie et ma famille en Tunisie pour leur patience et leur soutien. Leurs encouragements renouvelés au fil sinueux de mes études ont été le carburant de ce long trajet.



## AVANT-PROPOS

### PUBLICATIONS DANS CETTE THÈSE

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. In Press

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by batch and fed-batch culture using sewage sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. In Press

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in a pilot plant fermentor. Submitted for publication to *Bioresource Technology*.

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of *Bacillus thuringiensis* using Different Raw Materials. Submitted for publication to *Canadian Journal of Microbiology*.

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Submitted for publication to *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

A. Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, 2004. Protease Synthesis and Entomotoxicity Potency in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using sludge as a raw material. Submitted for publication to *Enzyme and Microbial Technology*.

## PUBLICATIONS HORS THÈSE

- A. Yezza, et J.L. Sasseville, 2004. Autoproduction industrielle des enzymes entrant dans la fabrication des pâtes et papiers : l'hypothèse de la xylanase. *Vecteur environnement*, Vol. 37 (4), 36-48.
- A. Yezza, A. Le Gars, J.L. Sasseville, M. Zaara. 2004. La Tunisie et le modèle public de distribution et d'exploitation de l'eau potable : la place des partenariats publics-privés. *Desalination*, Reçu 21 novembre 2003; accepté 12 mars 2004.
- J.L. Sasseville, A. Yezza, 2004. La rationalité des transferts massifs d'eaux douces. Un chapitre de livre sur les transferts massifs d'eaux douces. Éditeur : Frédéric Lasserre, Université Laval. *En édition*.
- F. Ben Rebah, D. Prévost, A. Yezza, R.D. Tyagi 2004. Waste materials for rhizobia-based inoculant production. *Accepté pour publication dans Journal of Environment Quality*.
- F. Ben Rebah, Y. Filali-Meknassi, A. Yezza, Tyagi R.D, Surampalli R.Y., 2002. Wastewater treatment as an approach for the recovery of value added products, Water and Waste water : Perspectives of Developing Countries, *Proceeding of the international Conference, WAPDEC, December 2002, New Delhi, India*.
- F. Ben Rebah, Y. Filali-Meknassi, A. Yezza, and R.D Tyagi, 2004. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by rihzobia growing in industrial wastewater and in sludge. The 5th Tunisia-Japan Symposium on science and technology. *Accepté pour publication dans Proceedings of Conferences, TJASST2004*.
- M. Zairi, M. Zaâra, A. Yezza. 2002. Évaluation des performances d'une station de dessalement par osmose inverse, *TSM AGHTM No.4, Avril 2002*, France.

## **CONGRÈS ET CONFÉRENCES**

YEZZA A., LE GARS A., SASSEVILLE J.L., ZAARA M. 2004. La Tunisie et le modèle public de distribution et d'exploitation de l'eau potable : la place des partenariats publics-privés. Séminaire INRS-Eau,Terre et Environnement, 04 Février 2004, Québec, Canada.

YEZZA A., TYAGI R.D., VALÉRO J. 2003. Production de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Congrès INRS Institut Armand-Frappier, 6-7-8 novembre 2003, Manoir du Lac Delage, Stoneham, Québec, Canada.

YEZZA A., TYAGI R.D., VALÉRO J. 2003. Incertitudes scientifiques et maîtrise des risques technologiques dans la mise à l'échelle du procédé de production de biopesticides à partir de boues d'épuration comme substrat, 19<sup>ème</sup> congrès de l'est du Canada de la recherche sur la qualité de l'eau, octobre 2003, Faculté de génie, Université de Sherbrooke (Canada).

FILALI-MEKNASSI Y., BEN REBAH A., YEZZA A., TYAGI R.D, SURAMPALLI R.Y., 2002. Traitement des eaux usées combiné à la production des produits à valeur ajoutée. 18<sup>ème</sup> congrès de l'est du Canada de la recherche sur la qualité de l'eau, octobre 2002, École polytechnique de Montréal, Canada.

ZAIRI M., ZAÂRA M., YEZZA A., 2002. Contribution à la modélisation du facteur de diagnostic du fonctionnement d'une station de dessalement par osmose inverse. [Diagnosis of a reverse osmosis desalination unit], Session Poster : Ressources et Gisements, Watmed 2002 Worshop (Tunisie), Octobre 2002.



## RÉSUMÉ

Les efforts de recherche sur la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* ont porté sur le développement de milieux de culture à base de matières tertiaires abondantes et disponibles permettant de réduire les coûts de production, principalement ceux liés au choix du milieu de culture. L'une des avancées les plus intéressantes est le développement d'un procédé de production de biopesticides à base de Bt utilisant les boues d'épuration comme substrat. L'optimisation des divers paramètres de fermentation (température, contrôle de pH, agitation, aération et  $K_{La}$ ), ainsi que l'optimisation du milieu de culture (pourcentage et âge de l'inoculum, la concentration de matières en suspension, le ratio C/N et les divers pré-traitements des boues) ont permis d'obtenir des progrès significatifs au domaine de l'efficacité de la méthode de fermentation et de l'entomotoxicité du produit final. Toutefois, sans une connaissance poussée de la mise à l'échelle, ces améliorations demeurent insuffisantes pour juger de l'efficacité industrielle de la méthode et de la capacité concurrentielle du produit. L'objectif principal de ce travail de recherche consiste donc à développer une technologie faisable à grande échelle pour la production de biopesticides à base de Bt utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation.

L'ensemble des stratégies développées dans cette étude montre clairement qu'il est possible d'améliorer les performances du procédé. À l'échelle pilote, une amélioration de 30 % du potentiel entomotoxique fut constatée. La plus haute activité protéolytique fut obtenue à l'échelle pilote (4,1UI/mL) en raison d'un meilleur transfert d'oxygène. Ces améliorations permettraient de concurrencer sérieusement les procédés de production classique, tant du point de vue de la rentabilité que de celui de la fiabilité. **1)** Une simple stratégie d'alimentation se basant sur la mesure de l'oxygène dissout a été développée dans ce travail. Il a été établi qu'en passant du mode de culture « *batch* » au mode « *fed batch* », la concentration maximale de spores était augmentée de  $5,6 \times 10^8$  à  $8,6 \times 10^8$  ufc/mL, alors que le potentiel entomotoxique passait de  $13 \times 10^9$  à  $18 \times 10^9$  SBU/L. L'accroissement de l'entomototoxicité en mode « *fed batch* » pourrait être dû à la production d'un plus grand nombre de spores et à la production de cristaux de plus grandes dimensions qui contiendraient d'avantage d'endotoxines que ceux qui sont produits en mode « *batch* ». **2)** Le type d'agents neutralisants semble aussi avoir un effet sur le potentiel entomotoxique. L'hydroxyde d'ammonium et l'acide acétique ont été utilisés comme agents

neutralisants durant la fermentation en remplacement du couple hydroxyde de sodium et acide sulfurique, ce changementn permettant d'accroître le potentiel entomotoxique de 22 % dans le cas des boues en provenance de la station d'épuration de la CUQS, de 21 % dans des boues de la station de JQS et de 14 % dans le milieu soja. Cette amélioration des performances du procédé résulterait de l'augmentation de sources de carbone et d'azote facilement assimilables provenant de l'addition des agents neutralisants, ce qui stimule la production d'endotoxines dans les cristaux et favorisant une meilleure maturation des spores. 3) Le pré-traitement thermo-alcalin des boues aussi permis d'améliorer les performances du procédé de production de Bt dans les boues d'épuration. L'hydrolyse de la matière organique complexe en molécules de plus petites tailles et en nutriments plus facilement assimilables par le Bt a permis d'augmenter le potentiel entomotoxique à la fin de la fermentation de  $12,3 \times 10^9$  SBU/L dans les boues non-traitées à  $16,6 \times 10^9$  SBU/L dans les boues pré-traitées. Cette amélioration du potentiel entomotoxique pourrait être attribuée à un meilleur transfert d'oxygène en raison d'une diminution de la viscosité et à une amélioration de la disponibilité des nutriments.

Nous avons montré qu'en dépit d'un grand nombre de spores obtenus lors de la fermentation du Bt dans le milieu traditionnel semi-synthétique à base de farine de soja, le potentiel entomotoxique dans ce dernier reste de loin inférieur à celui obtenu dans des milieux de culture à base de boues d'épuration municipales. Dans ces dernières, la synthèse du complexe spore-cristal semble être de meilleure qualité suite à une plus grande variété de nutriments présents dans les boues. De plus, il est vraisemblable que ce potentiel entomotoxique accru soit imputable à plusieurs autres facteurs biochimiques libérés lors de la lyse cellulaire et agissant sur la structure et ainsi sur la virulence des sites actifs des cristaux entomotoxiques.

Finalement, nous avons mis en évidence que l'activité protéolytique augmente au cours des premières phases du processus de fermentation avec la concentration de matières en suspension dans les boues et décline après avoir atteint un maximum 36 heures environ après le début de la fermentation. Indépendamment de la concentration de matières en suspension, et jusqu'au pic, i) l'activité protéolytique croît de façon exponentielle avec le compte de cellules total, et ii) le potentiel entomotoxique augmente de façon linéaire avec l'activité protéolytique. Ces travaux ont aussi permis d'établir une relation de type exponentielle entre le potentiel entomotoxique et la concentration de spores.

## ABSTRACT

Bt is commercially used to control insects-pests in forestry and agriculture; however, the utilisation of Bt has been restricted due to its high cost of production through fermentation. Safe and effective insects-pests control comes actually with a hefty price tag. An important aspect of cutting costs may be the substitution of high cost medium ingredients based on soy flour and fishmeal by complex, indigenous agro-industrial waste and wastewater sludge. The production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* based biopesticides using wastewater sludge as raw material was successfully achieved in our laboratory. The optimization of different fermentation parameters, namely, temperature, pH, agitation and aeration, volume and age of inoculum, sludge suspended solids concentration, C/N ratio and various pre-treatment methods of sludge, all those factors undeniably allowed for achieving higher entomotoxicity potency in the final product. However, this improvement remains insufficient for eventual commercialization. The primary aim of our investigation was to develop a suitable technology at large scale for the production of Bt based biopesticides using wastewater sludge as a raw material.

The Bt fermentation process using sludge as raw material was successfully scaled-up and resulted in high productivity for toxin protein yield and high protease activity. An improvement of 30 % of the entomotoxicity potential was obtained at pilot scale. Protease activity increased by 2 to 4 times at bench and pilot-scale, respectively, compared to the maximal activity obtained in shake flasks. The maximum protease activity was obtained in pilot scale (4.1 IU/mL) due to better oxygen transfer.

By adopting various operational process strategies, entomotoxicity potency has been substantially enhanced. This improvement would compete seriously with the conventional process. **1)** A simple fed batch strategy based on DO measurement during the fermentation cycle was developed in this work. It was established that while shifting the process strategy from batch to fed batch, the maximal spore concentration was increased from  $5.6 \times 10^8$  to  $8.6 \times 10^8$  cfu/mL and resulted in an increase of entomocidal activity from  $13 \times 10^9$  to  $18 \times 10^9$  SBU/L. It was assumed here that a large number of cells produced a correspondingly large number of spores, and

consequently, a large amount of insecticidal crystal proteins **2)** Ammonium hydroxide and acetic acid were used as pH control agents during *Bacillus thuringiensis* fermentation in a pilot scale fermentor (150L) employing two secondary wastewater sludges from two different wastewater treatment plants (CUQS and JQS) and semi-synthetic soybean meal as raw materials. Entomotoxicity potency was improved by 22 %, 21 % and 14 % in CUQS, JQS and soybean media, respectively compared to results obtained with NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents. This improvement in Bt process performance was a consequence of the addition of rapidly utilizable carbon and nitrogen source through pH control, which stimulated endotoxin production in the crystal and helped the spores to mature properly. **3)** Specific complex media such as sludge needs pre-treatment in order to transform less degradable compounds into more easily degradable ones. Thermo-alkaline treatment was found to be an effective process to enhance Bt process efficiency. The final entomotoxicity potency increased from  $12.3 \times 10^9$  SBU/L with the raw sludge to  $16.6 \times 10^9$  SBU/L with thermo-alkaline pre-treated sludge. This enhancement in process performance could be attributed to a better oxygen transfer due to decrease in media viscosity and improvement of nutrient availability due to sludge solubilization and biodegradability after harsh thermo-alkaline treatment.

Higher entomotoxicity was recorded at low spore concentration using wastewater sludge as a raw material whereas low entomotoxicity was reported at high spore concentration in synthetic medium. This enhancement in entomocidal activity could be attributed to better spore maturation in wastewater sludge and more toxic crystals than those produced in the synthetic medium. In fact, spore maturation and crystal synthesis needed a higher amino acids content and it seems that wastewater sludge provides a higher nutrient content compared to synthetic media.

Finally, we showed that, maximal protease activity increased with sludge suspended solids concentration. However, it decreased after attaining a peak at about 36h. Irrespective of sludge suspended solids concentration, protease activity (until it peaked) showed an exponential relationship with total cell count and a linear relationship with entomotoxicity potency. An exponential correlation was also established between spore concentration and entomotoxicity.

## TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE .....	23
1.1    Introduction.....	3
1.1.1    Les boues d'épuration : un casse tête mondial.....	3
1.1.2    Coût prohibitif des biopesticides .....	4
1.1.3    Production de biopesticide à base de Bt dans des milieux de culture non conventionnels .....	5
1.2    Métabolisme de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
1.2.1    Croissance, sporulation et production des δ-endotoxines.....	7
1.2.2    Mode d'action et cible cellulaire du mélange endotoxines-spores .....	11
1.3    Les facteurs affectant la croissance, la sporulation et la synthèse des cristaux .....	13
1.3.1    La composition du milieu de culture .....	13
1.3.2    Température et pH de fermentation.....	14
1.3.3    Transfert d'oxygène .....	16
1.3.4    Mode de culture : comparaison entre les différents modes de culture.....	19
1.3.5    La mise à échelle.....	20
1.4    Production de biopesticides à base de Bt dans les biosolides.....	21
1.4.1    Optimisation de la concentration en matières en suspension.....	21
1.4.2    Optimisation de l'inoculum .....	22
1.4.3    Amélioration du transfert de l'oxygène .....	23
1.4.4    Induction abiotique de la sporulation.....	23
1.4.5    Optimisation du rapport C/N .....	24
1.4.6    Criblage de nouvelles souches .....	25
1.4.7    Contrôle de l'agitation et de l'aération .....	26

1.4.8	Ajout de nutriments.....	27
1.4.9	Pré-traitement des boues .....	28
1.4.10	Production simultanée de protéases et de biopesticides dans les biosolides .....	28
1.4.11	Contrôle de la formation de la mousse .....	29
1.5	Conclusion .....	31
1.6	Originalité, objectifs et hypothèses de la recherche.....	32
1.6.1	Originalité .....	32
1.6.2	Objectifs de recherche.....	33
1.6.3	Hypothèses de recherche.....	34
	PRÉSENTATION DES ARTICLES SERVANT DE CORPS À LA THÈSE.....	46
	<b>CHAPITRE 2: MISE À L'ÉCHELLE DU PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE BT DANS LES BOUES D'ÉPURATION.....</b>	<b>53</b>
	Partie I : Scale-up of Biopesticide Production Process Using Wastewater Sludge as a Raw Material.....	55
	Partie II: Bioconversion of Industrial Wastewater and Wastewater Sludge into <i>Bacillus thuringiensis</i> Based Biopesticides in Pilot Plant fermentor.....	81
	<b>CHAPITRE 3 : STRATEGIES DEVELOPPEES POUR L'AMELIORATION DU POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE.....</b>	<b>106</b>
	Partie I : Production of <i>Bacillus thuringiensis</i> based Biopesticides in Batch and Fed Batch Cultures using Wastewater Sludge as a Raw Material.....	108
	Partie II: Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of <i>Bacillus thuringiensis</i> using Different Raw Materials.....	132
	Partie III: Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .....	157

CHAPITRE 4 : CORRELATION ENTRE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE ET LE POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE.....	184
Correlation Between Entomotoxicity Potency and Protease Activity Produced by <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> Grown in Wastewater Sludge.....	186
CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	210
ANNEXES.....	221



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Effet des minéraux sur la croissance, la sporulation et la synthèse du cristal \_\_\_\_\_ 15

Tableau 2. Paramètres affectant le transfert d'oxygène dans un réacteur de type cuve agitée \_\_\_\_ 18



## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : La dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et synthèse de PHB (Liu, 1994) _____	10
Figure 2 : Mode d'action des toxines (De Maagd <i>et al.</i> , 2001) _____	12
Figure 3 : Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995) _____	17



## **CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE**



## 1.1 Introduction

### 1.1.1 Les boues d'épuration : un casse tête mondial

Compte tenu du développement croissant et de l'optimisation du fonctionnement du parc des stations d'épuration, la production de boues résiduaires ne cesse de croître et leur gestion représente des coûts de plus en plus importants. Au Québec, environ 200 000 tonnes de boues sèches sont générées, chaque année, par les stations d'épuration. Le coût du traitement et de disposition de ces résidus est de 300-400\$/tbs (tonne de boues sèches), soit environ 50 % du coût total du traitement des eaux usées (Kroiss, 2004).

La disposition des boues d'épuration des eaux usées de manière économique et acceptable sur le plan environnemental est un problème majeur auquel fait face aujourd'hui la société. Certaines stations les incinèrent, mais la majorité de ces résidus sont dirigées vers des lieux d'enfouissement sanitaire. Cette élimination par enfouissement ou par incinération va à l'encontre des politiques de conservation des ressources et de valorisation de la biomasse. De plus, au fil des ans, l'accès aux lieux d'enfouissement sanitaire paraît de plus en plus socialement difficile et coûteuse. La valorisation sylvicole et agricole des boues s'avère ainsi une filière de disposition qui cadre mieux avec les principes du développement durable. En effet, cette alternative est généralement préférée à l'incinération et ce d'autant qu'il paraît plus rationnel de valoriser un produit riche en matière organique et en sels nutritifs, plutôt que de le détruire. Ce mode de valorisation semble donc à la fois intéressant sur le plan économique et pertinent d'un point de vue environnemental. Toutefois, la concentration élevée en métaux toxiques dans les boues et la présence de microorganismes pathogènes constituent deux inconvénients majeurs à cette pratique. L'épandage sur les sols cultivés est de moins en moins bien accepté par le monde agricole qui redoute que les productions provenant des champs ayant reçu des boues ne bénéficient guère d'une bonne image auprès des consommateurs. À ceci, s'ajoutent des exigences gouvernementales de plus en plus strictes concernant la qualité des boues et la sécurité des méthodes de disposition, ce qui rend la gestion des boues d'épuration de plus en plus difficile.

Aussi, devant l'augmentation dramatique des quantités de boues, et dans un contexte de plus grande vigilance environnementale, une gestion durable des boues d'épuration s'impose, et dans ce cadre, il devient impératif d'identifier les solutions les moins coûteuses et les plus écologiques afin d'assurer un recyclage de ces boues (Rulkens, 2004; Odegaard, 2004). Une diversification des filières doit donc être envisagée. Les procédés de bioconversion des biosolides en divers produits à haute valeur ajoutée tel, par exemple, des protéines entomotoxiques, s'avèrent une solution innovante, performante, rentable et respectueuse de l'environnement.

### **1.1.2 Coût prohibitif des biopesticides**

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes entomopathogènes est une solution prometteuse pour assurer une protection phytosanitaire performante de par l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes, leur grande variété, leur dissémination facile, leur très grande sélectivité et aussi leur persistance dans l'environnement. Elle représente une alternative viable à l'utilisation des pesticides chimiques conventionnels, dont les répercussions sont nombreuses et indésirables. En effet, le développement de résistances chez les insectes cibles aux insecticides chimiques conventionnels et la volonté de préserver l'environnement, ont favorisé l'essor rapide des biopesticides. L'emploi de tels produits, tout en permettant une diminution des pesticides toxiques, favorise le retour à un cycle écologique normal et plus équilibré.

A l'heure actuelle, plus de 90 % des biopesticides produits à l'échelle mondiale et utilisés dans la lutte contre les insectes nuisibles (lépidoptères, diptères et coléoptères) sont dérivés du *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Glare et O'Callaghan, 2000). Ils constituent un traitement privilégié pour lutter en particulier contre la chenille tordeuse des bourgeons de l'épinette mais également contre un large éventail d'insectes ravageurs des forêts et des cultures (Valéro *et al.*, 1999).

Les ventes annuelles de formulation de Bt sont estimées à 100 millions de dollars, un marché contrôlé par une poignée de fournisseurs (Bishop, 2002). Ces ventes représentent moins de 1 % du marché mondial potentiel évalué à 5 milliards de dollars (Whalon and Winger, 2003), pourcentage pouvant atteindre 10 à 15 % dans un proche avenir (Bishop, 2002).

En conclusion, le Bt offre des perspectives commerciales intéressantes. Cependant, son coût de fabrication demeure relativement coûteux si on la compare avec les pesticides chimiques : l'approvisionnement en farine de soja, farine de poisson et tourteau de coton, qui constituent les milieux dans lequel les bactéries du Bt sont cultivées devient de plus en plus onéreux (Bernhard et Utz, 1993). Stanbury *et al.* (1995) et Lisansky *et al.* (1993) estiment que 35 à 59 % des coûts de production sont liés au substrat de fermentation. Par conséquent, la sélection du milieu de culture est critique pour la production commerciale de Bt.

### **1.1.3 Production de biopesticide à base de Bt dans des milieux de culture non conventionnels**

Afin d'encourager la production commerciale de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis*, plusieurs milieux de culture non conventionnels à base de rejets d'industries agro-alimentaires et de boues municipales ont été testés dans différents pays. Dans chaque cas, le choix du milieu de culture était justifié par la faisabilité économique du projet (variable suivant les pays et notamment dans les pays en voie de développement) et par sa capacité à produire des endotoxines.

Contrairement aux milieux synthétiques traditionnels, ces matières tertiaires sont abondantes, abordables et peu dispendieuses. Ce mode de valorisation présente un double avantage puisqu'il permet de résoudre dans certains cas les problèmes liés au traitement et à la gestion de ces matières résiduaires, tout en permettant la production de produit à haute valeur ajoutée. Ainsi, des rejets agroalimentaires comme les farines de soja, de maïs, de riz, de poisson, la liqueur de trempage de maïs, les mélasses, les résidus des industries papetières, les arachides, la levure fourragère, le petit lait, les déchets d'abattoirs de volailles et les pelures de pomme de terre, ont été abondamment cités dans la littérature (Zouari *et al.*, 2002a-b; Abdel-Hameed, 2001; Khuzamshukurov *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 1999; Vega, 1999; Vora et Sethna, 1999; Alves *et al.*, 1997; Salama et Morris, 1993; Lee et Seleena, 1991; Ejiofor, 1991; Mummigatti et Raghunathan, 1990; Ejiofor et Okafor, 1989; Salama *et al.*, 1983).

L'une des avancées les plus passionnantes est l'utilisation des biosolides comme substrat de culture de Bt (Tirado-Montiel, 1997). Ils peuvent offrir un milieu de culture adapté à la production de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis*. Il s'agit donc là d'une contribution importante au développement durable, non seulement parce que les coûts de production sont réduits, mais aussi parce qu'il s'agit de transformer des déchets en éléments productifs. Enfin, le produit qui en résulte est socialement utile et sans danger pour l'environnement. Les biosolides sont déjà utilisés comme engrais pour l'agriculture et la sylviculture. Son application comme milieu de culture pour la production de biopesticide semble être compatible avec les exigences environnementales (Barnabé *et al.*, 2003).

Le coût des biosolides utilisés comme substrat de fermentation pour la production de biopesticide à base de Bt est limité par les frais de transport. En se basant sur les résultats de laboratoire incluant les frais de ce dernier, le prix des infrastructures et équipements et le coût de maintenance et d'opération. Sachdeva *et al.* (2000), estiment un coût de production de Bt dans les boues de 0,7\$/L contre 1,0\$/L pour le milieu synthétique à base de soja, et ce pour une activité entomotoxique de 35B ( $10 \times 10^9$  UI/L). L'activité biologique de la suspension obtenue dans les boues est 4 fois plus importante que celle obtenue directement en milieu standard : dans les boues, la suspension titre  $17,9 \times 10^9$  UI/L (UI : Unité Internationale) ou 68 BIU/US Gallon contre seulement  $4,2 \times 10^9$  IU/L ou 15,8 BIU/US Gallon dans le substrat synthétique (Sachdeva *et al.*, 2000).

Les préparations de Bt obtenues en utilisant des boues comme substrat présentent plusieurs avantages, entre autres une faible concentration en solides, une basse viscosité, une faible sédimentation, une haute suspensibilité et surtout des particules de faibles dimension. Une petite taille de particules est souhaitable pour les préparations commerciales de Bt afin d'obtenir un meilleur épandage aérien du produit. La granulométrie des particules calculée dans les boues secondaires ne dépasse pas 1 µm (Sachdeva *et al.*, 2000). Pour les formulations commerciales, la taille des suspensions se situe entre 3 µm et 25 µm avec 99 % de particules devant être inférieures à 5 µm (Bernhard et Utz, 1993).

## **1.2 Métabolisme de *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* couramment désigné sous l'acronyme Bt est une bactérie omniprésente. Elle fut isolée pour la première fois en 1901, dans une magnanerie (lieu d'élevage de ver à soi) au Japon, par Ishiwata (Dulmage et Aizawa, 1982). En 1911, le biologiste allemand Berliner identifiait sur des chrysalides infectées de la teigne de la farine un *Bacillus* qui fut baptisé du nom de la province de Thuringe où il avait été isolé. Mais c'est en France, en 1938, que les premières formulations commerciales furent réalisées. Alors connues sous le nom de sporéine, elles étaient utilisées comme insecticide agricole (Burges, 2001). Cependant le produit n'étant pas encore au point, il a été peu utilisé commercialement. Puis, dans les années 1950, il fut prouvé que *Bacillus thuringiensis* tuait les larves de lépidoptères grâce à une inclusion protéique aux propriétés insecticides appelée cristal.

Il fallut attendre le début des années 1970 pour que la recherche améliore la formulation du produit existant et amène la découverte de nouvelles souches. Le Bt a alors suscité un intérêt croissant (Otvos et Vanderveen, 1993). Aujourd'hui, plus de 50 000 souches de Bt ont été isolées.

### **1.2.1 Croissance, sporulation et production des δ-endotoxines**

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie naturellement présente dans le sol, entomopathogène, anaérobie facultative, en forme de bâtonnet, Gram-positive, flagellée, caractérisée par la production durant la sporulation d'un corps parasporal, le cristal.

Le cycle de croissance du *Bacillus thuringiensis* est caractérisé par une alternance de trois phases : après inoculation, une phase d'adaptation qui s'ensuit d'une phase de croissance rapide. Le Bt se multiplie de façon végétative pendant laquelle des cellules se divisent de façon exponentielle, par scissiparité, jusqu'à ce que le milieu soit appauvri pour l'un des nutriments essentiels. Il entre alors en phase stationnaire et s'engage dans un processus qui aboutit à la sporulation (Luthy *et al.*, 1982). Durant la phase de croissance végétative, les cellules de Bt utilisent le carbone comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse des protéines et autres métabolites. Lors du passage de la phase végétative à la sporulation, des changements

significatifs sont observés au niveau du métabolisme, de la physiologie et de la cinétique cellulaire (Rivera *et al.*, 1999).

La sporulation est une manifestation physiologique correspondant à une crise de la bactérie réagissant à des conditions ambiantes difficiles. Elle s'accompagne de modifications profondes du métabolisme pouvant aller jusqu'à l'apparition d'une virulence et à la synthèse de toxines faisant suite à la dégradation du glucose en sucre réducteur assimilé par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (Aronson, 2002; Luthy *et al.*, 1982; Bulla *et al.*, 1980). Mignone et Avignone-Rossa (1996) ont montré que la production et la consommation de l'acide acétique libéré lors de la croissance de Bt sont très importantes pour la sporulation. Du point de vue biochimique, la sporulation peut être initiée par un épuisement de nutriments clés tels que le glucose, l'azote et les phosphates (Liu et Tzeng, 2000; Yang et Wang 2000; Sasaki *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1995). On note une réduction du taux de croissance cellulaire pendant la formation de la spore, du fait de la diminution de l'énergie nécessaire pour exécuter la fission binaire (Rivera *et al.*, 1999).

*Bacillus thuringiensis* est actif contre les insectes grâce à une inclusion cristalline de forme bipyramidaire, composée de protéines insecticides codées par des gènes Cry, : les δ-endotoxines (DE Maagd *et al.*, 2001; Granados *et al.*, 2001; Schnepf *et al.*, 1998). Ces protéines sont synthétisées pendant la phase stationnaire, en même temps que la sporulation. Elles s'accumulent dans la cellule mère pour former un cristal, également appelé corps parasporal qui, en fin de sporulation, peut représenter environ 20 à 30 % du poids sec de la bactérie. Ce cristal est généralement composé de 95 % de protéines et 5 % de carbohydrates (Ellar 1997; Agaisse et Lereclus, 1995). La production des δ-endotoxines est promue à de hautes concentrations d'acéate ou de poly-3-hydroxybutyrate (PHB) dans le milieu au début de la formation du cristal (Liu et Tzeng, 2000).

La production de spores et de cristaux protéiques est un phénomène complexe, impliquant la transformation d'acides aminés déjà synthétisés durant la croissance végétative (Liu et Tzeng, 2000; Starzak et Bajpai, 1991). Bien que la formation de l'inclusion cristalline et celle des spores soient considérées comme deux phénomènes indépendants, il a été rapporté qu'un blocage au niveau de l'expression des plasmides suite à des conditions défavorables au début de la sporulation pouvait empêcher la formation du cristal (Rivera *et al.*, 1999).

Bt est une bactérie hétéroorganotrophe (*chemoheterotroph*). Pendant la phase exponentielle, la dégradation de glucose en sucre réducteur est assimilée par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (Luthy *et al.*, 1982; Bulla *et al.*, 1980). Suite à cette dégradation, une grande quantité d'acide organique est libérée dans le milieu durant la phase de croissance, induisant une chute de pH (Chen *et al.*, 1997; Avignone-Rosa et Mignone, 1992; Rowe et Margaratis, 1987). L'acide acétique produit et consommé par la cellule représente un métabolite clé. Il est le précurseur de la production du PHB. Les acétates sont partiellement converties en PHB intracellulaires. Ces granules de biopolymère stimulées par un excès de sucre dans le milieu de culture sont accumulées comme réserve intracellulaire de carbone lors de la phase exponentielle de croissance (Popovic *et al.*, 2001; Benoit *et al.*, 1990). La Figure 1, illustre le mécanisme de dégradation du glucose et la synthèse de PHB.

Par la suite, les acétates et les PHB sont assimilés par le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), source importante d'énergie pour la croissance et la sporulation (Feng *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1994). Ce processus est étroitement associé à l'induction de la sporulation (Bulla *et al.*, 1980; Benoit *et al.*, 1990).

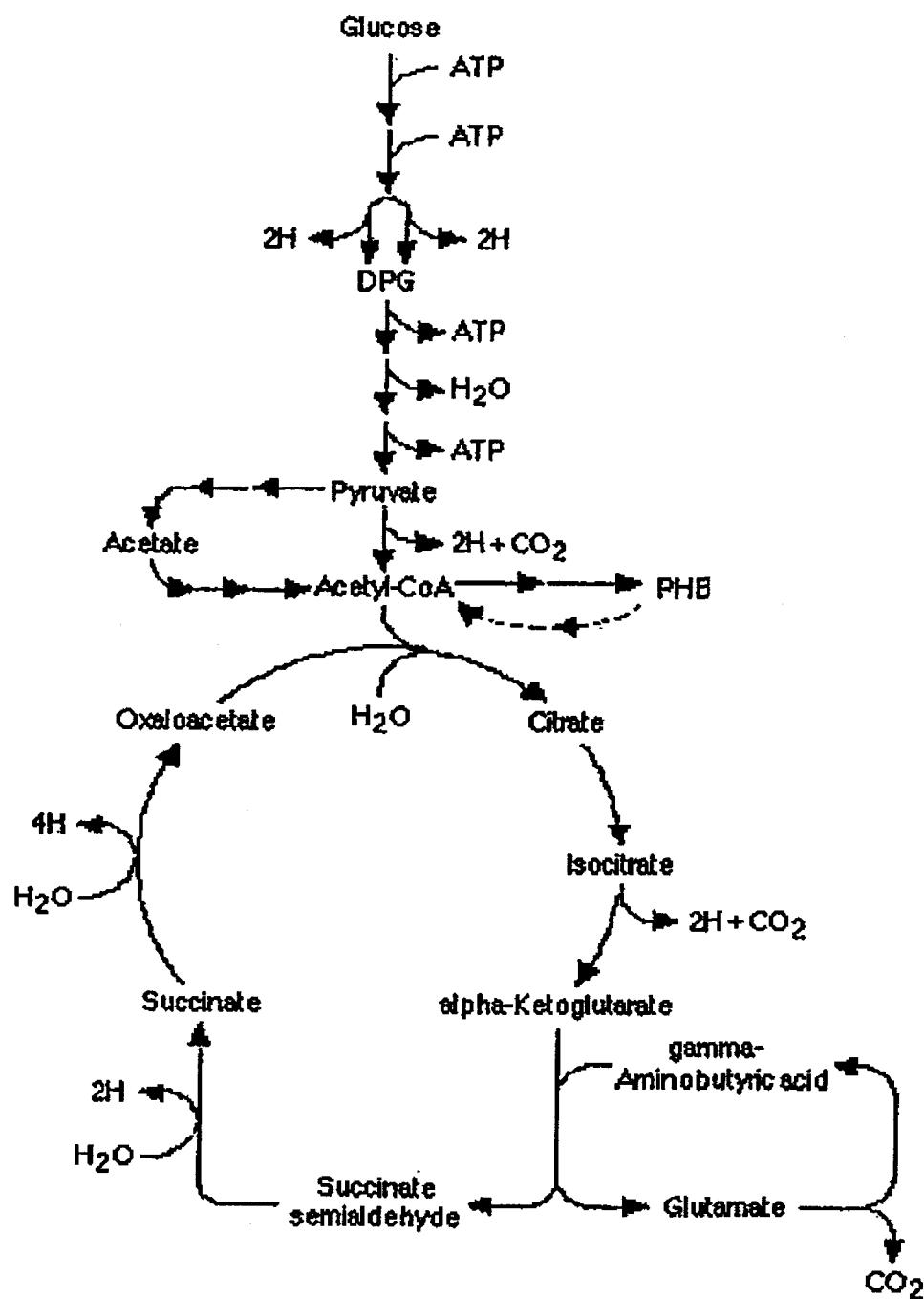


Figure 1 : La dégradation du glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et synthèse de PHB (Liu, 1994)

### 1.2.2 Mode d'action et cible cellulaire du mélange endotoxines-spores

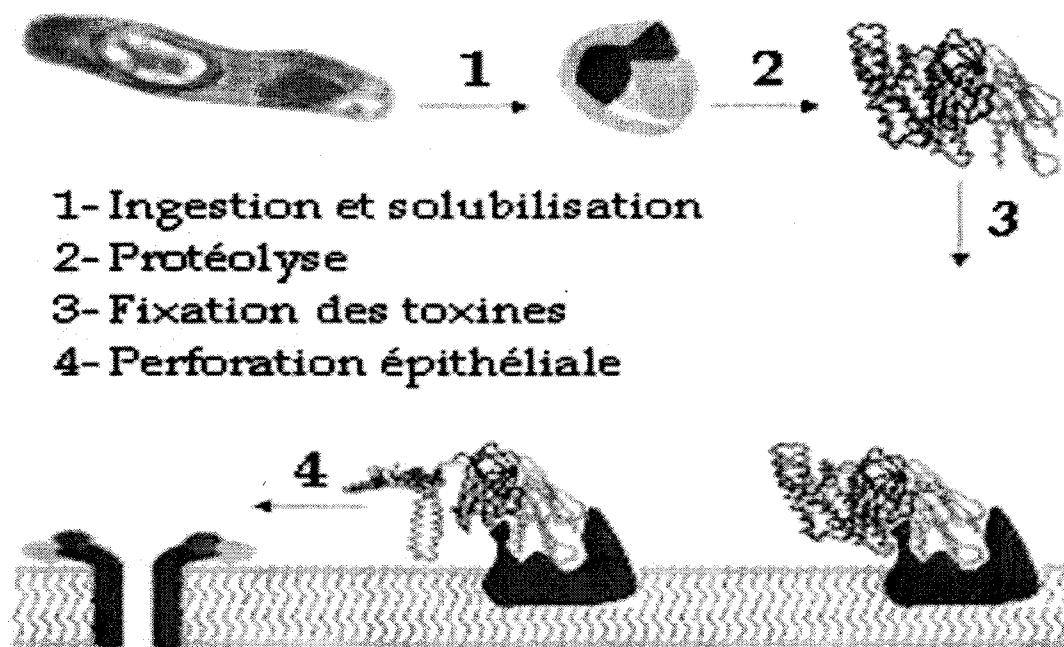
Contrairement aux insecticides chimiques qui sont actifs par contact, les toxines de Bt doivent être ingérées par la larve pour produire ses effets dans l'intestin de l'insecte. C'est le mélange spore-cristal qui agit comme toxines intestinales. Valéro (1990) a montré que le mélange spores-cristaux est 4 à 5 fois plus pathogène que des solutions ne contenant que l'un ou l'autre.

La Figure 2 présente un schéma simplifié du mode d'action des toxines tel qu'il est habituellement formulé. Une fois que les protéines cristallines ont été ingérées par les larves, elles sont solubilisées dans le tractus digestif et sont transformées en toxines actives par des enzymes spécifiques : les protéases intestinales. Mentionnons que cette solubilisation du cristal n'a lieu que dans un milieu basique à un pH compris entre 9 et 11, pH qui se retrouve dans l'estomac de la tordeuse alors que l'estomac de nombreux êtres vivants est acide (Prieto-Samsonov *et al.*, 1997). De plus, ce pH stomacal basique, contribue à créer des conditions favorables à la germination des spores de Bt (Salamitou *et al.*, 1996). Cette toxine active se fixe ensuite à un récepteur spécifique présent à la surface membranaire des cellules de l'épithélium intestinal. Après insertion dans la membrane, elle génère la formation d'un pore et provoque un déséquilibre osmotique et la lyse cellulaire (Kwa *et al.*, 1998 ; Prieto-Samsonov *et al.*, 1997; Van Rie *et al.*, 1992).

La perméabilisation et la destruction des cellules épithéliales conduit à une paralysie du système digestif des larves qui cessent rapidement de s'alimenter et meurent en un ou deux jours (Burges, 2001; Oppert, 1999; Marrone et Macintosh, 1993). La germination des spores et la prolifération de cellules bactériennes végétatives dans l'hémocèle peut entraîner une septicémie qui conduit également à la mort (Rajamohan *et al.*, 1996 ; Strizhov *et al.*, 1996). En outre, si le Bt n'est pas transmissible à la progéniture, il provoque des perturbations métaboliques importantes chez l'insecte qui ont pour effet de réduire la viabilité de la descendance par effet de rémanence (Smirnoff, 1991).

L'utilisation de Bt pour la lutte biologique présente toutefois deux limites majeures. D'une part, la persistance de son activité dans la nature est généralement plus faible que celle des insecticides chimiques. La résistance des spores et des cristaux dépend de la formulation utilisée ainsi que de divers facteurs écologiques, tant physiques que biotiques. Cependant, les spores ont tendance à disparaître plus rapidement que les cristaux (Van Frankenhuyzen 1993 ; Luthy *et al.*, 1982). Ces derniers sont inactivés par les rayonnements ultraviolets alors que la pluie provoque un lessivage des produits bactériens (Cohen *et al.*, 1991).

## ***Bacillus thuringiensis***



**Figure 2 : Mode d'action des toxines (De Maagd *et al.*, 2001)**

### 1.3 Les facteurs affectant la croissance, la sporulation et la synthèse des cristaux

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

#### 1.3.1 La composition du milieu de culture

Le pouvoir insecticide du Bt dépend de l'activité intrinsèque de la bactérie (diversité des toxines) ainsi que de la composition du substrat de fermentation (Khuzamshukurov *et al.*, 2001). Perani et Bishop (2000), Alves *et al.* (1997), Faloci *et al.* (1993) et Yudina *et al.* (1993) ont observé que la composition du milieu de culture affecte la concentration des δ-endotoxines, la taille et la forme du cristal et par conséquent le potentiel entomotoxique. L'optimisation du milieu de culture est associée à un large nombre de paramètres physiologiques et nutritionnels, entre autres, le rapport C/N, la concentration en azote et carbone, sans négliger les minéraux. Plusieurs chercheurs ont montré que le processus de formation des spores et de synthèse des cristaux dépend de la balance azote/carbone.

À travers la relation étroite entre la formation du cristal et la sporulation, la régulation par les sources de carbone peut être considérée comme un contrôle direct de la formation de l'inclusion parasporale, ou encore un effet indirect résultant de la stimulation ou de la suppression de la sporulation (Içgen *et al.*, 2002b; Zouari *et al.*, 1998; Liu et Bajpai, 1994; Rowe et Margaritis, 1987). Généralement, l'absence de source de carbone inhibe la sporulation (Nickerson et Bulla, 1974). Un changement de la source de carbone provoque des variations au niveau de la croissance de Bt et de la taille du cristal (Farrera *et al.*, 1998 ; Yudina *et al.*, 1993).

L'azote semble être le facteur le plus déterminant lors de la multiplication cellulaire et de la sporulation puisqu'il intervient dans la synthèse des protéines cellulaires, des enveloppes des spores et dans la synthèse des acides nucléiques. Les sources d'azote exercent un contrôle direct sur la formation du cristal par stimulation de la production des endotoxines (Içgen *et al.*, 2002b ; Zouari *et al.*, 1998; Pearson et Ward, 1988).

Yang et Wang (2000) ont conclu que les sources d'azote organique et inorganique dans le milieu de culture sont épuisées lors du commencement de la synthèse des protéines toxiques et c'est cet épuisement total d'azote qui déclenche la sporulation et la synthèse des cristaux.

Les sources d'azote organique, telles que les peptones et le soja, sont généralement requises pour une croissance rapide. Le peptone est la meilleure source d'azote organique assurant une densité cellulaire élevée, une bonne sporulation et une production optimale de toxines (Içgen *et al.*, 2002b). Zouari *et al.* (2002a-b), Zouari et Jaoua (1999a), Arcas *et al.* (1987) et Bulla *et al.* (1980) ont observé que l'utilisation de source d'azote inorganique telle que le sulfate d'ammonium n'est pas suffisante pour la croissance du Bt. Elle provoque en particulier une altération saisissante des protéines toxiques du cristal (Içgen *et al.*, 2002b).

Même en présence d'un substrat complexe, des concentrations seuils en oligo-éléments et minéraux sont requises pour une meilleure croissance, sporulation et synthèse de cristaux (Bernhard et Utz, 1993). Le Tableau 1 résume l'ensemble de ces minéraux et leurs effets respectifs sur la croissance, la sporulation et la synthèse des cristaux par *Bacillus thuringiensis*.

### **1.3.2 Température et pH de fermentation**

La température de culture de Bt varie en fonction du milieu de culture, des modifications génétiques et des phases de croissance. Les cellules de Bt croissent mieux pour une plage de température comprise entre 28 et 32°C (Dulmage *et al.*, 1990).

D'autres travaux rapportent que la température typique pour la culture de Bt est de 28°C pour une souche de Bt modifiée génétiquement (Yang et Wang, 2000). Cette stratégie permet de réduire le temps de fermentation et la demande en oxygène de la culture, et donc les coûts de fermentation liés à l'énergie fournie lors de l'agitation et de l'aération (Yang et Wang, 2000). Il n'est pas souhaitable de descendre au-dessous de 28°C.

La sporulation des bactéries est réduite à un pH supérieur à 7,6 et diminue considérablement sous pH=6. Elle est inhibée sous 5,5 (Salama *et al.*, 1983; Morries *et al.*, 1996). Braun (2000) a observé plus de spores à pH neutre qu'à pH 6 ou 8.

**Tableau 1. Effet des minéraux sur la croissance, la sporulation et la synthèse du cristal**

<b>Minéraux</b>	<b>Effets sur la croissance, la sporulation et la synthèse des cristaux</b>	<b>Références</b>
<u>Manganèse</u>	Il apparaît comme l'élément le plus critique, vu qu'une grande augmentation est détectée dans le rendement des toxines Cry4Ba et Cry11Aa. Toutefois, cet élément doit exister en quantité suffisante pour ne pas empêcher la production des toxines. L'absence de Mn dans le milieu réduit le taux de sporulation et la synthèse du cristal.	Ozkan <i>et al.</i> , 2003 Içgen <i>et al.</i> , 2002a Braun, 2000
<u>Magnésium</u>	L'omission de magnésium dans un milieu de culture Yousten, réduit la croissance et la sporulation, mais l'effet le plus prononcé est observé au niveau de la synthèse de l'inclusion cristalline paraspore. Le Mg agit également comme un régulateur enzymatique, par l'activation de quelques enzymes impliquées dans la formation des spores.	Içgen <i>et al.</i> , 2002a Yasemin <i>et al.</i> , 2002
<u>Calcium</u>	Le calcium joue un rôle important dans la formation de spores puisqu'il contribue à la thermorésistance de ces dernières. Il a été démontré que l'ion Ca est stimulateur de la sporulation, nonobstant qu'il n'a pas d'effet significatif sur la croissance et la synthèse du cristal.	Yasemin <i>et al.</i> , 2002
<u>Sodium</u>	Le sodium intervient dans les échanges membranaires. Il a été démontré qu'une concentration de 0.5 g/l de chlorure de sodium améliore significativement la production des δ-endotoxines lors de la culture de Bt dans un milieu composé de gruau et de farine de poisson.	Zouari <i>et al.</i> , 2002a
<u>Potassium</u>	Le potassium est nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes, y compris celles qui interviennent dans la synthèse protéique. Il a été démontré que le potassium stimule la production des δ-endotoxines. Il pourrait aussi augmenter la thermorésistance des cellules.	Wakisaka <i>et al.</i> , 1982 Foda <i>et al.</i> , 1985 Abrosimova <i>et al.</i> , 1986
<u>Phosphate</u>	Le phosphate agit comme régulateur dans la synthèse de métabolites primaires et secondaires. Il stimule la production des cristaux.	Gupta <i>et al.</i> , 2002 Abrosimova <i>et al.</i> , 1986
<u>Cuivre</u>	Le Cu <sup>2+</sup> améliore la croissance de Bt, toutefois des concentrations élevées sont susceptibles d'inhiber la croissance bactérienne.	Jun <i>et al.</i> , 2003
<u>Zinc</u>	Des concentrations élevées de Zn réduisent significativement la sporulation; de plus, la synthèse du cristal est légèrement plus importante en absence de cet élément.	Içgen <i>et al.</i> , 2002a Yasemin <i>et al.</i> , 2002

### **1.3.3 Transfert d'oxygène**

Le transfert d'oxygène jusqu'au sein du milieu de culture constitue un problème critique. Il a été démontré que lors du transfert d'oxygène depuis la bulle d'air jusqu'aux systèmes enzymatiques internes de la cellule microbienne (Figure 3), c'est le passage de l'oxygène au sein du liquide qui offre la plus grande résistance. En considérant ce transfert au travers de l'interface air/liquide, on peut appliquer la loi de Fick :

$$\frac{dN}{dt} = -D \cdot a \cdot \frac{dc}{dx}$$

dN : Nombre de molécules transférées pendant l'intervalle de temps dt (sec)

D : Coefficient de diffusion (cm<sup>2</sup>/s)

a : Aire interfaciale (cm<sup>2</sup>)

dc : Variation de la concentration du soluté (moles/cm<sup>3</sup>) au cours de son trajet dx (cm) au travers de la membrane cellulaire.

La vitesse de dissolution de l'oxygène dans un milieu aqueux est régie par la loi des gradients de concentration. Elle se traduit au niveau mathématique par l'équation :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L \cdot a \cdot (C^* - C_L)$$

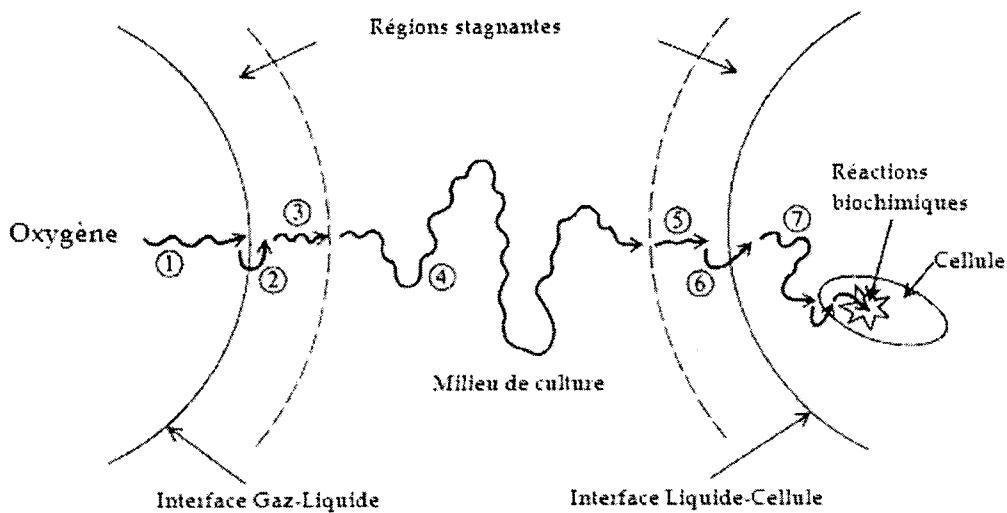
où :

K<sub>L</sub> : Coefficient de facilité correspondant à l'interface de la valeur des trois résistances au transfert de matière qu'une molécule d'oxygène doit traverser avant sa dissolution (couche limite côté gaz, interface gaz liquide et couche limite côté liquide). K<sub>L</sub> = D/x (épaisseur de la membrane)

a : Aire de la surface d'échange

C<sup>\*</sup> : Concentration saturante en oxygène dans le milieu de culture (mmol/L).

C<sub>L</sub>: Concentration initiale en oxygène dissout dans le milieu de culture (mmol/L).



**Figure 3 : Étapes du transfert d'oxygène de la bulle d'air vers la cellule (Doran, 1995)**

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

La formation des spores et la synthèse de cristaux sont étroitement dépendantes de la disponibilité d'O<sub>2</sub> dans le milieu de culture (Zouari *et al.*, 2002a; Abdel-Hammed, 2001; Avignone-Rossa *et al.*, 1992). Ce transfert d'oxygène est fonction du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ). Ce dernier caractérise le transfert gaz-liquide, dont l'équation aux dimensions est exprimée en inverse du temps. C'est aussi l'un des facteurs les plus importants pour la mise à l'échelle du procédé. En pratique, la mesure de ce coefficient exprime la capacité d'oxygénéation du milieu contenu dans le bioréacteur. Il est couramment utilisé pour mesurer le taux de transfert d'oxygène (OTR) et le taux de consommation d'oxygène (OUR). Les paramètres qui affectent le transfert d'oxygène dans un réacteur type cuve agitée et les performances du procédé de fermentation de Bt sont illustrés dans le Tableau 2.

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

Paramètres	Effet sur le transfert d'oxygène	Références
<b><u>Viscosité</u></b>	La viscosité est la principale différence significative entre les milieux de fermentation commercialisés. Il a été observé que le $K_{La}$ variait au cours de la fermentation et qu'il dépendait de la viscosité apparente du milieu. L'augmentation de la viscosité fait diminuer les valeurs du $K_{La}$ .	Ozergin-Ulgen et Mavituna, 1998 Ozbek et Gayik, 2001 Humphrey, 1998
<b><u>Température</u></b>	Une diminution de la solubilité des gaz est observée lors d'une augmentation de température. Néanmoins, le $K_{La}$ s'accroît suite à une augmentation de diffusion de l'oxygène dans le liquide. Le taux de transfert d'oxygène augmente de 15 % lorsque la température passe de 20°C à 30°C.	Doran, 1995
<b><u>Sels</u></b>	Pour de fortes concentrations en sels, $K_{La}$ et la solubilité de l'oxygène diminuent et contribuent à la baisse du taux de transfert d'oxygène.	Imai et al., 1987 Kappeli et Fiechter, 1981
<b><u>Taille des particules</u></b>	$K_{La}$ augmente avec la taille des particules en suspension. Une des raisons plausibles de cette augmentation peut être la turbulence du film liquide des grosses particules, qui sont peut être plus violentes que les petites.	Ozbek et Gayik, 2001
<b><u>Agitation &amp; aération</u></b>	Le $K_{La}$ augmente avec la vitesse de rotation des turbines et le taux d'aération, l'influence de la vitesse de rotation sur le $K_{La}$ est plus importante que celle de l'aération.	Sachidanandham et al., 1999 Abdel-hameed, 2001
<b><u>Vélocité superficielle</u></b>	$K_{La}$ augmente significativement pour un accroissement de la vélocité superficielle du gaz. Les petites bulles d'air permettent d'avoir une surface interstitielle ( $a$ ) plus importante que les grosses bulles d'air. Un autre avantage des petites bulles, est que leur vitesse d'ascension à la surface est plus lente, elles restent donc plus longtemps dans le liquide accordant ainsi plus de temps à l'oxygène pour se dissoudre. Le diamètre des bulles d'air couramment utilisé dans les fermentations industrielles varie entre 1.5 à 10 mm	Jin et al., 1999 Doran, 1995 Juarez et Orejas, 2001
<b><u>Anti-mousse</u></b>	L'anti-mousse affecte le comportement et les interactions hydrodynamiques des bulles ainsi que le taux de transfert de masse. Une baisse de la tension de surface augmente le diamètre moyen des bulles et fait donc baisser le $K_{La}$ .	Al-Masry, 1999 Parakulsuksatid, 2000

### 1.3.4 Mode de culture : comparaison entre les différents modes de culture

Sous des conditions contrôlées de pH et d'oxygène dissout, la production de spores et des toxines peut être améliorée en mode batch, en mode continu et en mode expansé (*Fed batch*). Comme il s'agit de production de métabolites secondaires, le mode de culture de Bt le plus répandu est le mode batch (Arcas *et al.*, 1987; Avignone-Rossa et Mignone, 1993). Dans ce processus, le réacteur est rempli avec un substrat de nutriments stériles et inoculé avec les microorganismes. Durant toute la fermentation, seules sont ajoutés, l'air, l'agent anti-mousse, l'acide et l'alcalin afin de contrôler le pH.

La culture continue est caractérisée par l'égalité des débits d'alimentation et de récolte de la culture. Le chémostat permet d'effectuer des cultures dans un système ouvert et à l'équilibre. La culture se maintient indéfiniment en phase exponentielle, réalisant un état stationnaire apparent. Les travaux de recherche ont été limités au stade de la production de spores (Mignone et Avignone-Rossa, 1996; Kang *et al.* 1993; Goldberg *et al.*, 1980). En général, les cultures en mode continu ne conviennent pas pour les bactéries sporulantes car le système devient instable très rapidement (Selinger *et al.*, 1988).

La culture en mode Fed batch permet d'obtenir, par apport contrôlé de milieux frais, de fortes concentrations cellulaires ainsi qu'une augmentation de la productivité et une baisse du coût des produits industriels (Callewaert et De Vuyst, 2000; Giridhar et Srivastava, 2001; Sasaki *et al.*, 1998; Korz *et al.*, 1995 ; Longobardi, 1994). Ce mode de culture se caractérise par un temps de travail un peu plus long, certainement accepté par les pratiques industrielles qui, actuellement, utilisent souvent des procédés de stérilisation et de prévention de contamination plus efficace (Longobardi, 1994). Le contrôle d'une culture à volume expansé vise principalement à maintenir une stratégie d'alimentation appropriée (*proper feed rate of substrate*) pour prévenir une inhibition par le substrat (surnutrition ou sous-nutrition) (Lee *et al.*, 1999; Vallejo *et al.*, 1999; Jong *et al.*, 1995; Kuppusamy et Balaraman, 1991 ).

Kang *et al.* (1992) ont obtenu une concentration en spores de  $1,25 \times 10^{10}$  spores/mL par l'emploi d'un procédé fed batch intermittent (IFBC) et en modifiant le milieu GYS. Pour empêcher que le substrat puisse limiter la croissance des cellules et pour maintenir leur vitesse de croissance, on ajoute au milieu de l'extrait de levure et du glucose par intermittence à une concentration de 10,

20 et 40 g/L. La masse cellulaire obtenue par IFBC augmente proportionnellement en fonction de la quantité de glucose consommée et atteint la valeur maximale immédiatement après l'épuisement du glucose. La forte concentration de spores obtenue par IFBC semble être due à une croissance rapide des cellules avec apport contrôlé de substrat (Kang *et al.*, 1992; Goldberg *et al.*, 1980). Les travaux d'Avignone-Rossa et Mignone (1993) confirment cette hypothèse; ils ont montré qu'une croissance exponentielle rapide est essentielle pour obtenir un niveau de toxicité assez élevé et que, quand l'une ou l'autre des sources de carbone et d'azote devient limitée, seule une petite fraction de la toxicité maximale est obtenue. Il est à signaler que la synthèse des delta-endotoxines est affectée lorsque la croissance exponentielle n'a pas lieu.

### **1.3.5 La mise à échelle**

La mise à échelle correspond à l'augmentation du volume de fermentation, ce n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal. Il est bien connu qu'à grande échelle, les micro-organismes sont plus exposés au changement des paramètres environnementaux, entre autres, le pH, la température, l'oxygène dissous et la composition du milieu de culture. Ces variables présentent un effet substantiel sur la croissance cellulaire et la production de métabolites (Hsu et Wu, 2002; Humphrey, 1998). D'autres paramètres d'ordre opérationnel s'y ajoutent tels que la qualité du mélange, la physiologie et l'âge de l'inoculum, l'approvisionnement en milieu de culture, la formation de la mousse et le temps de stérilisation. Il est à noter que lors de la culture de Bt, les forces de cisaillement ne sont pas critiques lors de la mise à échelle (Flores *et al.*, 1997).

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

## 1.4 Production de biopesticides à base de Bt dans les biosolides

Les premiers travaux sur la production de biopesticide à base de Bt en utilisant les boues d'épuration remonte à une dizaine d'années. Tirado-Montiel (1997) a montré qu'il est possible de produire Bt dans les boues. Les résultats obtenus étaient fort encourageants, toutefois comme tout nouveau procédé, il était clair que des améliorations devaient y être apportées. L'ensemble des stratégies visant à améliorer la croissance, la sporulation, la synthèse de toxine et la production de protéases dans les boues d'épuration, sera exposé dans le prochain paragraphe.

### 1.4.1 Optimisation de la concentration en matières en suspension

Le transfert d'oxygène affecte grandement la croissance, la sporulation et la production de toxines. Ce transfert est fonction du milieu de culture, entre autre, la concentration en matières en suspension. Pour les fortes concentrations en solide, Farrera *et al.* (1998) ont remarqué que les cellules ne sont pas toutes à la même phase, certaines sporulent, tandis que d'autres libèrent des spores matures, il y en a même certaines qui germent. Il y a désynchronisation de la sporulation et donc allongement du temps de fermentation. Les hautes concentrations en sources de carbone et azote (liées aux hautes concentrations en solide) encore disponibles au début de la sporulation peuvent être à l'origine de cette désynchronisation (Farrera *et al.*, 1998).

Les faibles concentrations en solides offrent une meilleure mobilité pour la bactérie et un meilleur transfert d' $O_2$  en raison des faibles viscosités (Sachdeva *et al.*, 2000). Ces derniers ont observé une diminution de l'entomotoxicité pour une augmentation de concentration en solides des boues de 25 à 40 g/l. Vidyarthi *et al.*, (2002) appuient cette conclusion.

Cependant, pour des concentrations élevées en solides, le milieu de culture devient plus dense et visqueux, ce qui entrave le transfert d'oxygène et donc la croissance, la sporulation et la formation de cristaux (Vidyarthi *et al.*, 2002). À 46 g/L, la concentration en oxygène dissout tend vers 0. Ceci montre que les faibles concentrations en oxygène à concentration élevée de solide ne sont pas dues à leur consommation rapide par Bt, mais à la limitation au niveau du transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide (Lachhab *et al.*, 2001).

Lachhab *et al.* (2001) ont évalué l'effet de la concentration en matières en suspension (MES) du milieu de culture sur la croissance, la sporulation et la production de toxines. Pour Btk, l'entomotoxicité et le nombre de spores augmentent pour un accroissement de contenu solide entre 10 et 26g/L (Lachhab *et al.*, 2001). Une concentration optimale de 25g/L de MES a été retenue.

#### **1.4.2 Optimisation de l'inoculum**

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

Au début, Tirado-Montiel (1997) utilisait un inoculum de 1000 spores, préparé dans un milieu synthétique à base de TSB (*Tryptic Soy Broth*). Cet inoculum entraîne une phase de latence très longue et à une faible croissance de Bt (Tirado-Montiel *et al.*, 2001). Afin d'offrir une meilleure adaptation enzymatique de la souche, Lachhab *et al.* (2001) ont proposé de préparer la culture de départ à partir du substrat de fermentation. Ceci permet de réduire le temps d'adaptation et d'améliorer le taux de croissance spécifique, la sporulation et l'entomotoxicité.

L'utilisation d'un volume d'inoculum relativement faible (1 %) ou encore de plus grands volumes (4-5 %) provoque une diminution du potentiel entomotoxique (Lachhab *et al.*, 2001). Une forte concentration cellulaire initiale pourrait induire une consommation rapide de l'oxygène et des autres nutriments. Par conséquent, une limitation de ces éléments devrait amener de faibles taux de croissance. Un volume optimum d'inoculum de 2 % a été retenu, ce volume assurant une meilleure concentration cellulaire sans entraver la concentration d'oxygène dissout. Des pourcentages de sporulation de 96 % ont été reportés (Lachhab *et al.*, 2001).

L'âge de l'inoculum joue un rôle important dans le temps d'induction de la sporulation. Il est préférable d'inoculer le milieu avec une culture active en phase de croissance exponentielle, 10 à 12 heures après l'inoculation (Vidyardhi *et al.*, 2001). Les cellules en division sont plus énergiques (motiles) et leur métabolisme de synthèse d'enzymes inductibles est plus actif.

### 1.4.3 Amélioration du transfert de l'oxygène

D'après l'interprétation des résultats de fermentation obtenues par Lachhab *et al.*, (2001), une des facteurs qui expliquent les faibles performances du processus est le niveau de transfert d'oxygène limité résultant du faible taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide. Ce problème peut être réduit en ajoutant des surfactants. Certains agents actifs tels que le TWEEN 80 ont été utilisés lors des fermentations aérobiques afin d'améliorer la perméabilité de la membrane cellulaire et, par conséquent, l'assimilation des nutriments. Morries *et al.* (1996) ont montré que l'augmentation de la solubilité des nutriments améliore la toxicité de Bt.

Bien qu'elle induise des problèmes majeurs au niveau du transfert d'oxygène, une concentration élevée en solides est souhaitable afin d'améliorer le potentiel toxique durant le processus de fermentation des biosolides des boues (Vidyarthi *et al.*, 2001). Ces derniers ont montré que certains surfactants tels que ATLOX 847, ATPLUS 522 et TWEEN 85 stimulent la croissance et le potentiel toxique de Bt. Les stimuli les plus élevés sont obtenus lors de la fortification par TWEEN 80 suivi de TWEEN 85. En fioles, une concentration de 0.2 % (v/v) de TWEEN 80, additionné à une boue secondaire de la CUQ (25g/l) améliore, respectivement, le compte de cellules et de spores de 4 et 2 fois ainsi que le pouvoir toxique de 1.25 fois (Vidyarthi *et al.*, 2001). Récemment, sous des conditions contrôlées de pH et DO (bioréacteur 15L), Brar *et al.*, (2004) sont parvenus à améliorer le potentiel entomotoxique de l'ordre 26,6 %.

### 1.4.4 Induction abiotique de la sporulation

Un contrôle dynamique des paramètres abiotiques pourrait ralentir la croissance cellulaire et favoriser la production de spores et de toxines. Il est vraisemblable qu'un tel contrôle dynamique pourrait convenir au procédé de production de spores et de toxines de Bt dans les biosolides municipaux. Il est bien connu que les bactéries sporulent dans des conditions environnementales difficiles en raison notamment d'un manque de nutriments ou dû à des conditions ambiantes défavorables.

Avec des boues, Tirado-Montiel (1997) a montré que la croissance de Bt est affectée par les températures de fermentation entre 34 et 36°C. Ceci s'explique par le fait que certaines protéines et enzymes deviennent instables.

Des chocs de température et de pH ont été réalisés afin d'induire la sporulation et de permettre d'améliorer le potentiel entomotoxique. Le choc thermique appliqué après la phase de croissance exponentielle de Bt n'a pas eu un effet sur la sporulation et le potentiel toxique (Tirado-Montiel, 1997). Celle ci a recommandé de tester une réduction plus drastique de la température après la phase exponentielle, et de procéder à un choc de pH afin de promouvoir la sporulation et, donc, d'augmenter le nombre de spores et de cristaux. Barnabé (2000) a confirmé qu'une telle approche n'induit pas la sporulation et peut entraver la production d'entomotoxines en libérant les plasmides dans le milieu. Les chocs de pH influencent la disponibilité des éléments nécessaires à la formation de spores et des δ-endotoxines. Il agit au niveau des transferts membranaires (polarisation des membranes). Barnabé (2000) a testé ce phénomène en appliquant divers chocs de pH durant la phase de sporulation de Bt afin de maximiser le taux de sporulation et du potentiel toxique. Plusieurs stratégies de choc ont été expérimentées et l'entomotoxicité a été rehaussée de 14 à 26 % suivant les temps et le nombre de chocs.

La meilleure stratégie adoptée consiste à maintenir le pH à 7 durant les 15 premières heures. Vers la fin de la phase exponentielle (15<sup>ème</sup> heure), l'acide sulfurique est injecté pour abaisser le pH à 6, jusqu'à la 16<sup>ème</sup> heure. À ce moment on réajuste le pH à la neutralité avec de l'hydroxyde de sodium. Cette même manœuvre est répétée après 24 heures de fermentation. Cette stratégie permet d'obtenir un taux de sporulation de 90 % et un potentiel toxique de  $10 \times 10^9$  UI/L lors de la fermentation de Btk dans les boues secondaires de la CUQ en bioréacteur de 15L (Barnabé, 2000). Cependant, cette approche présente certaines lacunes. Le choix du temps du premier choc (15<sup>ème</sup> heure) se justifie à la fin de la phase exponentielle, mais cette dernière dépend de plusieurs paramètres de fermentation et elle n'est pas constante. Il serait préférable de réaliser le choc en se basant sur les changements de pH et d'oxygène dissous (DO). Vers la fin de la phase logarithmique, la DO et le pH commencent à augmenter après avoir chuté tout le long de la phase de croissance. De plus, il serait intéressant de bien optimiser les temps et le pH des chocs.

#### 1.4.5 Optimisation du rapport C/N

Généralement les boues primaires sont riches en carbone, tandis que les boues secondaires sont riches en azote (95 % de biomasse bactérienne). Dans cette optique, Vidyarthi *et al.*, (2002) ont réalisé diverses combinaisons de boues dans le but de contrôler le rapport C/N. Les résultats

obtenus confirment l'hypothèse de Sachdeva *et al.*, (2000), qui postule que le ratio C/N joue un rôle important dans la croissance, la sporulation et le pouvoir entomotoxique.

Le ratio C/N optimum suite à diverses combinaisons de boues (primaires, secondaires, mixtes et déshydratées) est compris entre 7,9 et 9,9 (Vidyarthi *et al.*, 2002). Toutefois, ce résultat reste à confirmer en bioréacteurs, de plus, cette étude n'a pas tenu compte de l'impact des polymères dans les boues déshydratées sur le potentiel entomotoxique. Pour des raisons techniques, nous ne pouvons pas utiliser les boues mixtes à cause de la présence de particules de sable qui peuvent détériorer les joints mécaniques. De même, que l'utilisation des boues déshydratées n'est pas conseillée, vu son aspect collant qui peut obstruer les sondes de contrôle de pH et de DO.

#### 1.4.6 Criblage de nouvelles souches

Les recherches accomplies dans le cadre du projet de production des biopesticides dans les boues ont généralement utilisé la souche standardisée Btk. Il s'agit de la souche utilisée à l'échelle commerciale dans des substrats de fermentation conventionnels à base de farine de soja. Il est plausible que de faibles productivités de Bt dans les boues soient dues à une mauvaise adaptation de Btk dans ce milieu de culture complexe.

Le criblage de nouvelles souches microbiennes de Bt à partir des boues est la solution la plus intéressante pour sélectionner des souches plus toxiques et mieux adaptées au milieu de culture non conventionnel. Dans cet esprit, diverses souches de Bt ont été isolées à partir des boues secondaires de la CUQ (Mohammedi, notes de recherche non publiées). Ces souches ont été testées en fioles afin d'évaluer leur potentiel entomotoxique et protéolytique. Les résultats obtenus suggèrent que le potentiel toxique de certaines souches est plus important que la souche commerciale Btk HD1. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces souches sont déjà adaptées au milieu de culture dont elles ont été isolées. Quant à l'activité enzymatique, elle était faible en raison des essais en fioles.

Les travaux de Lamontagne (2004) constituent la continuité des travaux de Mohammedi (notes de recherche non publiées). Elle a testé les diverses souches en bioréacteur de 15L. Son objectif était de sélectionner les meilleures souches de Bt isolées des boues donnent les meilleures productions simultanées de protéases et de toxines. Les résultats obtenus montrent que les

souches isolés Bt 4, 14 et 21 possèdent un énorme potentiel de production simultanée de toxines et protéases, en particulier, Bt 21, se distingue des autres. Elle présente une entomotoxicité élevée  $16 \times 10^9$  UI/L (après 36h) comparé à Btk ( $12 \times 10^9$  UI/L), et elle maintient en plus une activité enzymatique assez élevée (3,4 UI/ml) par rapport à Btk (2,5 UI/ml), et surtout elle est associé à une faible consommation d' $O_2$  en comparaison avec les autres souches. Il serait intéressant d'utiliser cette souche en la combinant avec les diverses stratégies développées ou qui le seront au cours du présent travail de recherche.

#### **1.4.7 Contrôle de l'agitation et de l'aération**

La consommation en oxygène varie au cours de la fermentation de Bt suivant la phase de croissance. Une forte demande en oxygène est exigée lors de la croissance exponentielle, puis cette dernière se stabilise dès le début de la sporulation. Un contrôle adéquat de l'agitation et de l'aération permet de minimiser les coûts de production. L'approche courante consiste à maintenir au-dessus de 30 % de saturation la concentration de l'oxygène dissous, en manipulant les taux d'agitation et d'aération (Abdel-Hammeed, 2001; Mignone et Avignone-Rossa, 1996).

Lorsqu'il s'agit des boues d'épuration, l'agitation et l'aération du substrat influencent beaucoup les mécanismes de croissance et de production du complexe spores-cristaux (Vidyarthi *et al.*, 2002; Lachhab *et al.*, 2001). Vidyarthi *et al.* (non publié) ont étudié l'effet de la concentration en oxygène en faisant varier les taux d'aération (0.4 à 1.2 vvm) et celui d'agitation (400 à 700 rpm). Ils ont montré que des limitations en oxygène durant la phase exponentielle réduisent la concentration cellulaire, produisant moins de spores et donc moins de cristaux libérés. Les meilleurs rendements sont obtenus pour des taux d'aération et d'agitation respectifs de 0.5 vvm et 600 rpm. Dans ces conditions les valeurs de  $K_{La}$ , OTR et OUR sont à leur maximum. Sous des conditions limitées en oxygène (0.3vvm et 400 rpm), l'entomotoxicité a été réduite de 30 % comparée à celle obtenue dans des conditions non limitées. Ces résultats concordent donc avec les travaux de Abdel-Hameed (2001) qui a rapporté une diminution de 50 % de l'entomotoxicité lors d'un faible transfert d' $O_2$  utilisant de la liqueur de trempage de maïs comme substrat de fermentation.

Les forts taux d'aération ne favorisent pas un meilleur rendement, l'excès d'oxygène inhibent la croissance cellulaire et la formation de métabolite (Abdel-Hameed, 2001; Sachidanandham *et al.*,

1999). De plus, ces taux d'aération élevés favorisent la formation excessive de mousse qui constitue un grand problème lors de fermentation de Bt. Pour des raisons économiques, il est souhaitable d'augmenter si nécessaire l'agitation et d'éviter l'aération.

Les divers taux d'agitation et d'aération utilisés lors de l'étude de Vidyarthi *et al.* (non publié) ne montrent pas de variations significatives au niveau du potentiel entomotoxique de Bt. On ne peut pas conclure en ce qui concerne les taux d'agitation et d'aération optimal, car en plus de ces deux paramètres, le transfert dépend de plusieurs autres facteurs (Cf, Tableau 2). Finalement, il est déconseillé de garder les taux d'agitation et d'aération fixes tout au long de la fermentation.

#### 1.4.8 Ajout de nutriments

La présence en milieu de culture des sources disponibles de carbone et d'azote pour le métabolisme microbien influence la durée de la phase exponentielle et ainsi la concentration en cellules et spores viables, de même que la synthèse de toxine (Tirado-Montiel *et al.*, 2001). Cependant, ces sources ne sont pas toutes disponible et assimilable par la bactérie. Tirado-Montiel (1997) a proposé d'enrichir ce milieu par des suppléments nutritifs tels que le glucose, le sulfate d'ammonium, les extraits de levure ou encore les boues de levure afin d'améliorer la production du complexe spores-cristaux. Meunier (1999) a montré qu'un apport exogène de source de carbone facilement assimilable tels que la dextrine, le glucose ou la mélasse, permet d'accroître les rendements.

LeBlanc (2004) a procédé à divers ajouts de glucose, de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure afin d'évaluer leur effet sur la croissance, la sporulation et le potentiel entomotoxique. Les meilleurs résultats d'entomotoxicité ont été rapportés lors de l'ajout de 2g/L de glucose avant inoculation dans des boues secondaires hydrolysées de la CUQ. Un maximum de 15 147 UI/ $\mu$ L en potentiel entomotoxique a été atteint, ce qui montre une amélioration de 30 % par rapport à l'échantillon sans traitement ni ajout. L'ajout de source d'azote inorganique réduit le rendement, ce qui concorde avec les résultats de la littérature. En effet, il a été démontré par (Içgen *et al.*, 2002b) que les sources d'azote organiques altèrent considérablement la composition des protéines toxiques du cristal.

#### **1.4.9 Pré-traitement des boues**

Il a été démontré qu'une hydrolyse préliminaire des boues accroît la présence des sources de carbone, d'azote et de nutriments sous forme facilement assimilables par la bactérie (Ben Rebah, 2001; Sachdeva *et al.*, 2000; Meunier, 1999). En effet, ce pré-traitement détruit les membranes cellulaires et rend les protéines plus accessibles. Il permet de solubiliser les substances organiques contenues dans les boues et de former des substances organiques dégradables, en particulier, les acides gras qui sont d'excellentes sources de carbone (Novelli *et al.*, 1995).

Dans le cas de production de toxines de Bt dans les biosolides, les travaux de LeBlanc (2004), Barnabé (2004) et Tirado-Montiel (1997) ont conclu qu'un pré-traitement adéquat permettrait d'améliorer le pouvoir毒ique. Cette amélioration est tributaire du type d'hydrolyse ainsi que des caractéristiques physico-chimiques de la boue utilisée. Les divers types d'hydrolyse ont été bien détaillés dans les recherches de Ben Rebah *et al.* (2001) et Barnabé (2004).

L'hydrolyse thermique alcaline semble offrir les meilleurs résultats (LeBlanc, 2004; Barnabé, 2004). Ce pré-traitement est réalisé en micro-ondes, sans agitation du milieu de culture. Des essais d'optimisation doivent être effectués en hydrolyseur, sous une agitation permanente. Le chauffage du milieu de culture se fera par injection de vapeur. L'optimisation de ce pré-traitement constitue le travail de recherche de Barnabé (2004). Il faut rappeler qu'il n'existe pas une stratégie applicable pour tous les types de boues : par exemple, Tirado-Montiel (1997) a montré que certaines boues n'ont pas besoin d'un pré-traitement.

#### **1.4.10 Production simultanée de protéases et de biopesticides dans les biosolides**

Bt appartient à un groupe de bacilles qui sécrètent dans le milieu de culture un ensemble d'enzymes dégradatives lors de l'entrée en phase stationnaire. Ces enzymes permettent aux micro-organismes d'exploiter au mieux les différentes sources de nutriments présentes dans l'environnement.

Plusieurs travaux de recherche ont pu démontrer qu'il est possible de produire concurremment des toxines et des protéases dans les boues d'épuration (Lamontagne, 2004; Tyagi *et al.*, 2002). En effet plus le substrat est complexe, meilleure est l'activité hydrolytique, sans effet négatif sur la production de delta-endotoxines (Zouari et Jaoua, 1999b).

Les premiers travaux de production d'enzymes dans les biosolides ont été menés par Meunier (1999). Elle a montré qu'il est possible de produire des protéases bactériennes à des coûts de production moindres, à partir des boues d'épuration municipales. Elle a prouvé que la croissance des microorganismes producteurs de protéases dans les boues d'épuration est semblable à celle obtenue en milieu synthétique. Toutefois, elle n'a pas obtenu de résultats intéressants en ce qui concerne l'activité protéolytique; Ceci s'explique par le fait que ces expériences ont été réalisées en fioles, ce qui n'a pas permis de contrôler le pH et ne garantit pas un bon transfert d'oxygène.

Meunier (1999) a suggéré d'utiliser des boues secondaires âgées, ayant donc subies une nitrification importante, de manière à réduire les teneurs en azote ammoniacal dans le milieu et à augmenter les concentrations en nitrate bénéfiques au procédé de production de protéases à partir de boues d'épuration. Elle recommande aussi de réaliser ces essais en bioréacteur avec des conditions de fermentation contrôlées et d'optimiser les conditions de production afin de hausser et de stabiliser les rendements de production. Tyagi *et al.* (2002) ont obtenu des activités protéolytiques en fermenteur 4 fois plus élevées qu'en fioles lors de la fermentation de Bt dans les boues. Ceci pourrait être dû à un meilleur contrôle du pH et du transfert d'oxygène. Les changements de pH pendant la croissance de Bt peuvent désactiver les enzymes protéolytiques. De plus, ils ont montré que le maximum d'activité est obtenu vers la fin de la fermentation.

Les travaux de Lamontagne (2004) et de Tyagi *et al.* (2002) ont montré que non seulement l'utilisation des boues comme substrat de fermentation offre une meilleure production en biopesticide que les milieux synthétiques, mais qu'il est également possible de produire conjointement aux toxines, des protéases sans affecter la toxicité du produit final. Cette meilleure entomotoxicité enregistrée dans les boues a été attribuée à une meilleure qualité des cristaux. Barnabé (2004) a montré que les cristaux isolés dans le cas des boues sont plus toxiques que ceux produits en milieu synthétique à base de farine de soja. De plus des formulations faibles en protéases offrant un produit plus stable. Il est donc préférable de centrifuger le produit final, afin de réduire l'effet négatif des protéases et récupérer ces enzymes.

#### **1.4.11 Contrôle de la formation de la mousse**

La formation de mousse constitue un problème très sérieux en fermentation. Ce phénomène devient plus sérieux dans les cas des boues en raison de la présence de protéines, de divers

nutriments et des débris de cellules, favorisant ainsi la formation de mousse. La formation de mousse est dépendante de la concentration en solides de la boue, du type et de la composition de celle-ci ainsi que des particules colloïdales présentes dans la boue. Dans la culture de Bt, la formation de mousse survient lors de la stérilisation et après inoculation, au début de la phase logarithmique, quand le milieu de culture est riche en protéines non digérées (Vidayarthi *et al.*, 2002). Qualitativement, Vidyarthi *et al.*, (2000) ont observé une formation de mousse plus intense lors de la fermentation de Bt dans les boues mixtes que dans celle des boues secondaires. Le contrôle est de plus en plus difficile pour des MES supérieures à 25 g/l, surtout pour des volumes plus importants.

Le contrôle de la mousse s'effectue manuellement ou automatiquement avec un brise-mousse mécanique et/ou par des agents anti-mousse. Diverses techniques permettent soit d'éviter la formation de mousse (moyens antimousses) soit de la détruire (moyens démoussants). Les méthodes mécaniques de destruction de mousse sont utiles car ces dernières ne produisent pas de changement sur les propriétés du milieu de culture et minimisent les coûts de fermentation en économisant sur les anti-mousses chimiques. Les brises-mousse mécaniques sont avantageux. Cependant, ces méthodes requièrent de l'énergie, et leur capacité de réduire la mousse est limitée dans les cas de cultures de forte production de mousse comme les boues d'épuration. Par conséquent, l'utilisation d'anti-mousse chimique devient inévitable. Toutefois, elle n'est pas sans conséquence sur le rendement et la productivité. L'addition d'anti-mousse chimique est connue pour affecter le comportement hydrodynamique des bulles et le taux de transfert d'oxygène. L'anti-mousse chimique abaisse la concentration cellulaire et le pourcentage de sporulation, en plus d'une chute de production d'endotoxines. La présence d'anti-mousse chimique peut favoriser l'association des spores avec les plus grosses particules en suspension des boues qui ne peuvent pas pénétrer dans la valve d'échantillonnage et rendre les spores inaccessibles aux dénombrement. Le compte de spores, de même que l'entomotoxicité, sont sévèrement affectés par l'addition de PPG lors de la culture de Bt dans les boues en fioles. Vidayrthi *et al.*, (2000) ont observé une perte de 30 % du pouvoir toxique lors de l'ajout de 0.3 % (v/v) de PPG.

Les huiles naturelles telles que les huiles d'olive, d'arachide et de canola peuvent être utilisées comme supresseur de mousse. De plus, elles constituent une source de carbone (Hilton, 1999). Vidyarthi *et al.* (2000) ont montré que ces huiles n'affectent pas la croissance et l'entomotoxicité

de Bt. Ils en ont conclu que les huiles de canola, d'olive et d'arachide sont très efficaces pour le contrôle de mousse. Ces huiles améliorent la concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture, en agissant comme des vecteurs pour l'oxygène.

## **1.5 Conclusion**

Bt a suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Les efforts de recherche sur la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* se sont intégralement concentrés sur le développement de milieux de culture alternatifs à base de matières tertiaires abondantes et disponibles permettant de réduire les coûts de production, principalement liés au milieu de culture. L'une des avancées les plus intéressantes est le développement d'un procédé de production de biopesticides à base de Bt en utilisant les boues d'épuration comme substrat. L'optimisation des divers paramètres de fermentation (température, contrôle de pH, transfert d'oxygène), ainsi que l'optimisation du milieu de culture (volume, physiologie et âge de l'inoculum, la concentration en matière en suspension, le ratio C/N et les divers traitements des boues) ont permis, certes, d'obtenir d'indéniables progrès concernant l'efficacité et les performances du produit. Toutefois, ces améliorations demeurent insuffisantes pour justifier les investissements requis pour mettre au point un procédé commercialisable. Les potentiels entomotoxiques obtenus sont en deçà de ceux commercialisé et la technologie n'est pas encore à son optimum.

*En se basant sur la littérature, les problématiques spécifiques à l'actuel projet de recherche se résument en (4) points :*

- 1- La totalité des travaux réalisés à date, ont été réalisés en fioles ou en bioréacteur de 15 L. Les résultats obtenus sont forts encourageants, toutefois, ils restent insuffisants pour la commercialisation du procédé. Des tests d'efficacité à grande échelle et de détermination des coûts de production sont indispensables afin de convaincre les compagnies à investir dans le projet.

- 2- La totalité des travaux réalisés à date, l'ont été en mode batch. Le principal inconvénient de ce mode de culture est la longue période de non-productivité (*down time*) entre chaque batch lors du remplissage et de la vidange de la cuve du fermenteur, du lavage, de la calibration des sondes, de la stérilisation et du processus de redémarrage. La culture en mode Fed batch permet d'obtenir, par apport contrôlé de milieux frais, une augmentation significative du nombre de cellules, de spores et d'endotoxines ainsi qu'une augmentation de la productivité et une baisse du coût des produits industriels.
- 3- Les boues d'épurations sont riches en matière complexe et hétérogène contenant différents types de matières organiques biodégradables. Cependant, ces dernières ne sont pas toutes facilement assimilables par Bt, ce qui pourrait influencer la sporulation et la synthèse des cristaux. Il est primordial d'accroître la disponibilité de carbone et de l'azote facilement assimilables par la bactérie.
- 4- Une activité entomotoxique accrue a été attribuée à i) un taux maximal de croissance spécifique élevé, ii) un compte de spore élevé et iii) une meilleure maturation des spores. Toutefois, le rôle des protéases alcalines sur la production des spores et sur le potentiel entomotoxique, n'a pas été clairement établi.

## **1.6 Originalité, objectifs et hypothèses de la recherche**

### **1.6.1 Originalité**

*Bacillus thuringiensis* est actif contre les insectes grâce à une inclusion cristalline composées de différentes protéines insecticides dépendamment de la taille et de la forme du cristal (Yudina *et al.*, 1993). La production de ces protéines est étroitement liée à l'expression de plasmides qui définissent l'activité insecticide de la bactérie (Schnepf *et al.*, 1998). Les gènes Cry de Bt codant pour les δ-endotoxines sont généralement localisés sur des grands plasmides de taille comprise entre 40 et 200kb (Aronson, 2002). Ces gènes codant pour les δ-endotoxines sont exprimés spécifiquement pendant la phase stationnaire de façon concomitante à la sporulation; ils peuvent représenter jusqu'à 30 % du poids sec des cellules en sporulation (Salamitou *et al.*, 1996).

Les milieux de culture complexes tels que les boues d'épuration induisent des changements dans la production spécifique de ces plasmides. L'expression de ces derniers semble être affectée par plusieurs facteurs entre autres, i) la complexité et la disponibilité des nutriments, ii) le métabolisme de la bactérie, et iii) les conditions et paramètres opérationnels de fermentation.

**L'originalité de mon travail de recherche réside dans le développement d'une stratégie de production de Bt à haute densité cellulaire, à grande échelle, qui, intégrant les stratégies développées, permettrait la conception d'un procédé efficace, concurrentiel, et attrayant pour l'industrie. En effet, les travaux de mise à l'échelle en vue de la production commerciale de biopesticides à partir de boues d'épuration n'ont pas, à la connaissance de l'auteur, été réalisés auparavant.**

### **1.6.2 Objectifs de recherche**

Notre objectif principal est de développer une technologie applicable à grande échelle pour la production de biopesticides à base de Bt utilisant les matières tertiaires comme substrat de fermentation. Il s'agit de mettre au point un procédé capable d'offrir un produit plus performant (meilleur potentiel insecticide), obtenu à partir de ressources renouvelables (boues d'épuration et eaux usées industrielles) et respectant, finalement, les impératifs du développement durable.

Pour atteindre cet objectif, plusieurs travaux doivent être effectués :

- 1- Établir la reproductibilité des résultats obtenus en fioles et en bioréacteur de 15 litres à l'échelle pilote (bioréacteur de 150 litres) : Les résultats de reproductibilité sont vitaux pour une analyse systématique de l'influence des paramètres du processus sur les performances de la fermentation.
- 2- Développer une stratégie de production de Bt à haute densité cellulaire (*Fed batch*) qui pourrait améliorer le potentiel entomotoxique sans compromettre la croissance de la bactérie.

- 3- Corriger les déficiences en éléments nutritifs requis pour la fermentation de Bt par un pré-traitement des boues ou, encore, par ajout au cours de la fermentation d'éléments nutritifs facilement utilisables.
- 4- Identifier le rôle des protéases alcalines sur le potentiel entomotoxique.

### **1.6.3 Hypothèses de recherche**

1. Sur la base des constations admises dans la littérature scientifique (section 1.3.5), nous devons nous attendre à ce que la mise à l'échelle améliore le potentiel entomotoxique suite à un meilleur contrôle du pH, de l'oxygène dissout et une meilleure homogénéisation du milieu de culture. Ces variables présentent un effet substantiel sur la croissance, la sporulation et la production de cristaux.
2. En se basant sur les travaux de recherche antérieurs montrant l'effet sur l'entomotoxicité de l'ajout de suppléments nutritifs tels que le glucose et l'extrait de levure (section 1.4.8) aux boues d'épuration a permis d'augmenter le potentiel entomotoxique. On suppose qu'un apport supplémentaire de nutriments au cours de la fermentation de Bt ou encore un pré-traitement des boues augmenterait la bio-disponibilité des éléments nutritifs facilement assimilables, nécessaire pour la croissance, la maturation des spores et la synthèse des cristaux.
3. Lors de la fermentation de Bt dans les boues, on note une production simultanée de protéases alcalines, de spores et d'endotoxines. Ces protéases hydrolysent la matière complexe en acides aminés nécessaires pour la maturation des spores et la synthèse des cristaux. Sur cette base, il semble qu'une relation pourrait exister entre le potentiel entomotoxique et la production des protéases alcalines.

## Références

- ABDEL-HAMEED A., 2001. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 17: 857-861.
- ABDEL-HAMEED A., CARLBERG G., EL-TAYEB O., 1990. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt, III: Selection of media for δ-endotoxin production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 6: 313-317.
- ABROSIMOVA L.I., BABAeva P.V., ZUBAREVA V.V., SHEVTSOV V.V., 1986. Influence of minerals salts on the level of exotoxin production and productivity of a culture of *Bacillus thuringiensis*, *Mikrobiologiya*, Vol. 55, No. 3: 440-444.
- ADAMS T.T., EITEMAN M.A., ADANG M.J., 1999. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media. *Bioresource Technology*, Vol. 67: 83-87.
- AGAISSE H., LERECLUS D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*, Vol. 177: 6027-6032.
- AL-MASRY W.A., 1999. Effects of antifoam and scale-up on operation of bioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, Vol. 38: 197-201.
- ALVES L.F.A., ALVES S.B., PEREIRA R.M., CAPALBO D.M.F., 1997. Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Science and Technology*, Vol. 7: 377-383.
- ARCAS J., YANTORNO O., ERTOLA R., 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters*, Vol. 9, No. 2 : 105-110.
- ARONSON A., 2002. Sporulation and δ-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 59: 417-425.
- AVIGNONE-ROSSA C., ARCAS J., MIGNONE C., 1992. *Bacillus thuringiensis*, sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 8: 301-304.
- AVIGNONE-ROSSA C., MIGNONE C., 1993. δ-endotoxin activity and spore production in batch and fed batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, Vol. 15(3): 295-300.
- BARNABÉ S., 2004. Bioconversion des boues d'épuration en biopesticides : accroître le potentiel nutritif des boues pour une meilleure valeur ajoutée. Thèse de doctorat, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.

- BARNABÉ S., SASSEVILLE J.L., TYAGI R.D., VALERO J., 2003. Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières?. *Vecteur environnement*, Vol. 36, No.2 : 50-62.
- BARNABÉ S., 2000, Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides : induction abiotique de sporulation chez *Bacillus thuringiensis*, Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.
- BEN REBAH F., TYAGI R.D., PREVOST D., 2001. Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of Rhizobia in sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 47: 467-474.
- BENOIT T.G., WILSON G.R., BAYGH C.L., 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 10: 15-18.
- BERNHARD K., UTZ R., 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticide for experimental and commercial uses. In: Entwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., Higgs S., (Eds.), *Bacillus thuringiensis*, An environment biopesticide, Theory and practise, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, pp. 255-267.
- BISHOP A., 2002. *Bacillus thuringiensis* insecticides. In Applications and systems of *Bacillus* and relatives. Edited by R. Berkley. Blackwell Science Inc., Malden, Mass. pp. 160-175.
- BRAUN S., 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses, CAB International 2000, Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, Eds. A.Navon and K.R.S. Ascher, pp. 49-72.
- BRAR S.K., VERMA M., BARNABÉ S., TYAGI R.D., VALÉRO J.R. AND R. SURAMPALLI. 2004. Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* Fermentation of Wastewater Sludges. Accepted for publication in Journal of Biotechnology & Bioengineering.
- BULLA L.A., BECHTEL D.B., KRAMER Y.I., SHETHNA Y.I., ARONSON A.I., FITZ-JAMES P.C., 1980. Ultra structure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 8: 174-204.
- BURGES H.D., 2001. *Bacillus thuringiensis* in pest control, *Pesticide Outlook*, June 2001: 90-98.
- CALLEWAERT R., DE VYUST L., 2000. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed batch fermentation. *Applied and Environment Microbiology*, Vol. 66(2): 606-613.
- COHEN E., ROZEN H., JOSEPH T., BRAUN S., MARGULIES L., 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* kurstaki from ultraviolet irradiation. *Journal of invertebrate Pathology*, Vol. 57, No. 3: 343-351.

- DE MAAGD R.A., BRAVO A., CRICKMORE N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, Vol. 17(4): 193-199.
- DORAN P.M., 1995, Bioprocess engineering Principles, Academic Press, San Diego, California.
- DULMAGE H.T., YOUSTEN A.A., SINGER S., LACEY L.A., 1990. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*, UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, p. 42.
- DULMAGE H.T., AIZAWA K., 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. *Microbial and Viral Pesticides*, éd. : Kurstak, E., pp. 209-237.
- 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. *Disc. Innovation*, Vol.3, No. 2: 85-8.
- EJIOFOR A.O., OKAFOR N., 1989. Production of mosquito larvical *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on raw material media from Nigeria. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol. 67: 5-9.
- ELLAR D.J., 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin and prospects for biopesticide improvement, *BCPC Symposium Proceedings: Novelty or necessity?*, No. 68: 83-100.
- FALOCI M.M., YANTORNO O.M., MARINO H.A., ARCAS J.A., ERTOLA R.J., 1993. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ-endotoxin, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 6: 32-38.
- FARRERA F., PEREZ-GUEVARA F., DE LA TORRE M., 1998. Carbon: Nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 49: 758-765.
- FENG K.C., LIU B.L., CHAN H.S., TZENG Y.M., 2001. Morphology of parasporal endotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* isolate A3-4. *World journal of Microbiology and biotechnology*, Vol. 17: 119-123.
- FLORES E.A., PEREZ F., DE LA TORRE M., 1997. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of fermentation and Bioengineering*, Vol.83, No.6: 561-564.
- FODA M.S., SALAMA H.F., SELIM M., 1985. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 22: 50-52.
- GIRIDHAR R., SRIVASTAVA A. K., 2001. Repeated Fed-batch Sorbose Fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Chemical and biochemical engineering*, Vol. 15, No. 3: 127-129.

- GLARE T.R., O'CALLAGHAN M., 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester: Wiley. 350 p.
- GOLDBERG I., SNEH B., BATTAT E., KLEIN D., 1980. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. *Biotechnology Letters*, Vol. 2: 419-426.
- GONZALEZ J.M., CARLTON B.C., 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin productin in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*, *Plasmid*, Vol. 11: 28-38.
- GRANADOS R.R., FU Y., CORSARO B., HUGHES P.R., 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Toxicity to Lepidopterous Species with the Enhancin from *Trichoplusia ni Granulovirus*. *Biological Control*, Vol. 20: 153-159.
- GUPTA R., BEG Q.K., CHAUHAM B., 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 60: 381-395.
- HILTON M.D., 1999. Small scale liquid fermentations, Manual of industrial Microbiology and Biotechnology, Second edition, Demain A.L et Davies J.E, ASM Press, Washington DC, pp. 49-60.
- HSU Y.L., WU W.T., 2002. A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*, Vol.11: 123–130.
- HUMPHREY A., 1998. Shake flasks to fermentor : What have we learned?. *Biotechnology progress*, Vol. 14, No. 1 :3-7.
- IÇGEN Y., IÇGEN B., OZCENGİZ, 2002a. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Research in Microbiology*, Vol. 153, No. 9: 599-604.
- IÇGEN Y., IÇGEN B., OZCENGİZ, 2002b. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of Carbon and nitrogen sources. *Research in Microbiology*, Vol. 153, No. 9: 605-609.
- IMAI Y., TAKEI H., MATSUMURA M., 1987. A simple Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> feeding method for Kla measurement in large-scale fermentors. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 29: 982-993.
- JIN B., LEEUWEN J., DOELLE H.W., YU Q., 1999. The influence of geometry on hydrodynamic and mass transfer characteristics in an external airlift reactor for the cultivation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 15: 73-79.

- JONG J., HSIUN D., Wu W., 1995. Fed-Batch Culture of *Bacillus thuringiensis* for Thuringiensin Production in a Tower Type Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 48: 207-213.
- JUAREZ P., OREJAS J., 2001. Oxygen transfer in a stirred reactor in laboratory scale. *Latin American Applied Research*, Vol. 31: 433-439.
- JUN Y., Yi L., YONG T., JIANBEN L., XIONG C., QIN Z., JIAJIN D., SONGSHENG Q., ZINIU Y., 2003. Action of Cu<sup>2+</sup> on *Bacillus thuringiensis* growth investigated by microcalorimetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 39 (6): 576-580.
- KANG B.C., LEE S.Y., CHANG H.N., 1992. Enhanced spore production of *bacillus thuringiensis* by fed batch culture. *Biotechnology letters*, Vol. 14, No. 8: 721-726.
- KANG B.C., LEE S.Y., CHANG H.N., 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* spores in total cell retention culture using an internal ceramic filter system. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42 : 1107-1112.
- KAPPELI O., FIECHTER A., 1981. On the methodology of oxygen transfer coefficient measurements. *Biotechnology Letters*, Vol.3 (10): 541-546.
- KHUZAMSHUKUROV N.A., YUSUPOV T.Y., KHALILOV I.M., GUZALOVA A.G., MURADOV M.M., DAVRANOV K.D., 2001. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 37, No. 6: 596-598.
- KORZ D., RINAS U., HELLMUTH K., SANDERS E.A., DECKWER W.D., 1995. Simple fed batch techniques for high cell density cultivation of *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, Vol. 39: 59-65.
- KROISS H. 2004. What is the potential for utilizing the resources in sludge?. *Water Science & Technology*, Vol. 49(10): 1-10.
- KUPPUSAMY M., Balaraman K., 1991. Fed batch fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesizing delta endotoxin. *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 29: 1031-1034.
- KWA M.S.G., DE MAAGD R.A., STIEKEMA W.J., VLAK J.M., BOSCH D., 1998. Toxicity and binding properties of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C to cultured insect cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 71: 121-127.
- LACHHAB K., TYAGI R.D., VALERO J.R., 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, Vol. 37(2): 197-208.
- LAMONTAGNE E., 2004. Production simultanée de protéases et d'entomotoxines par les souches de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cultivable dans les boues d'épuration, Mémoire de maîtrise, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, Canada.

- LEBLANC M.E., 2004. Effets des différentes stratégies et pré-traitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Mémoire de maîtrise, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, Canada.
- LEE H.L., SELEENA P., 1991. Fermentation of a Malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, Vol. 22, No. 1: 108-112.
- LEE J., LEE S.Y., PARK S., MIDDELBERG A.P.J., 1999. Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances*, Vol. 17: 29-48.
- LISANSKY S.G., QUINLAN R.J., TASSONI G., 1993. The *Bacillus thuringiensis* production handbook, Ed. CPL Scientific Limited, United Kingdom.
- LIU C.M., TZENG Y.M., 2000. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 68, No. 1: 11-17.
- LIU W.M., BIHARI V., BAJPAI R.K., 1995. A carbon-limited medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, Vol. 37, No. 14: 1-8.
- LIU W.M., 1994. High density cultivation of *Bacillus thuringiensis*, Ph.D Dissertation, University of Missouri-Columbia, USA.
- LIU W.M., BAJPAI R.K., 1994. A modified growth medium for *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Progress*, Vol. 11: 589-591.
- LIU W.M., BAJPAI R.K., BIHARI V., 1994. High cultivation of sporeformers, *Ann. NY Acad. Sci.*, Vol. 721: 310-325.
- LONGOBARDI G.P., 1994. Fed-Batch versus Batch Fermentation. *Bioprocess Engineering*, Vol. 10: 185-194
- LUTHY P., CORDIER J.L., FISCHER H.M., 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application, in Microbial and Viral Pesticides, E. Kurstak, Ed., Marcel Dekker Inc, New York, NY, pp. 35-74.
- MARRONE P.G., MACINTOSH S.C., 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and Resistance Management, *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, ENTWISTLE P.F., CORY J.S., BAILEY M.J., HIGGS S., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 221-235.
- MEUNIER N., 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales, Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.
- MIGNONE C., AVIGNONE-ROSSA C., 1996. Analysis of carbon flux in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 46: 78-84.

- MORRIES O.N., CONVERSE V., KANAGARATNAM P., DAVIES J.S., 1996. Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* HD133. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 67: 129-136.
- MUMMIGATTI S.G., RAGHUNATHAN A.N., 1990. Influence of media composition on the production of δ-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 55: 147-151.
- NICKERSON K.W., BULLA L.A., 1974. Physiology of spore-forming bacteria associated with insects. V. Minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology*, Vol. 28: 124-128.
- NOVELLI A., OTTONELLO F., CONVERTI A., LODI A., RAVATTI M., DEL BORGHI M., 1995. Alkaline hydrolysis for the treatment of the organic fraction of municipal solid wastes and sludges. *Chemical and Biochemistry engineering*, Vol. 9, No. 4 : 195-199.
- ODEGAARD H., 2004. Sludge minimization technologies-an overview. *Water Science & Technology*, Vol. 49(10): 31–40
- OPPERT B., 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 42: 1-12.
- OTVOS I., VANDEVEEN S., 1993. Environmental report 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, p. 81.
- OZBEK B., GAYIK S., 2001. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, Vol. 36: 729-741.
- OZERGIN-ULGEN K., MAVITUNA F., 1998. Oxygen Transfer and Uptake in Streptomyces coelicolor A3(2) Culture in a Batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 73: 243-250.
- OZKAN M., DILEK F.B., YETIS U., OZCENGIZ G., 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research in Microbiology*, Vol. 154: 49-53.
- PARAKULSUKSATID P., 2000. Utilization of microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot scale baker's yeast fermentation unit, Master Science, Faculty of the virginia, USA.
- PEARSON D., WARD O.P., 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnology Letters*, Vol. 10, No. 7: 451-456.
- PERANI M., BISHOP A., 2000. Effects of media composition on δ-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. *Microbios*, Vol. 101: 47-66.

- POPOVIC M.K., LIU W.M., IANNOTTI E.L., BAJPAI R.K., 2001. A mathematical model for vegetative growth of *Bacillus thuringiensis*. *Engineering Life Science*, Vol. 2: 85-90.
- PRIETO-SAMSONOV D.L., VASQUEZ-PADRON R.I., AYRA-PARDO C., GONZALEZ-CABRERA, DE LA RIVA G.A., 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 19: 202-219.
- RAJAMOHAN F., ALZATE O., COTRILL A., CURTISS A., DEAN D.H., 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93: 14338-14343.
- RIVERA D., MARGARATIS A., DE LASA H., 1999. A sporulation kinetic model for batch growth of *Bacillus thuringiensis*, *The Canadian Journal of Chemical engineering*, Vol. 77: 903-910.
- ROWE G.E., MARGARITIS A., 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol*, Vol. 6: 87-127.
- RULKENS W.H., 2004. Sustainable sludge management - what are the challenges for the future?. *Water Science & Technology*, Vol. 49(10): 11-19.
- SACHDEVA V., TYAGI R.D., VALERO J.R., 1999. Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Res. Devel. Microbiology*, Vol. 3: 363-375.
- SACHDEVA V., TYAGI R.D., VALERO J.R., 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology*, Vol. 42: 211-216.
- SACHIDANANDHAM R., KUMAR I.A., KRISHNAN M.R., JAYARAMAN K., 1999. Mathematical model based estimation of volumetric oxygen transfer coefficient(s) in the production of proteolytic enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioprocess Engineering*, Vol. 2: 319-322.
- SALAMA H.S, MORRIS O.N., 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: Entwistle PF, Cory JS, Baily MJ, Higgs S, editors. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Great Britain: Wiley, p. 237-53.
- SALAMA H.S., FODA M.S., DULMAGE H.T., EL-SHARABY A., 1983. Novel fermentation media of δ-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol.41: 8-19.
- SALAMITOU S., MARCHAL M., LERECLUS D., 1996. *Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif. *Annales de l'Institut Pasteur, Acutalités*, Vol. 7(4) : 285-296.
- SASAKI K., JIAVIRIYABOONYA S., ROGERS P.L., 1998. Enhancement of sporulation and crystal toxin production by cornsteep liquor feeding during intermittent fed-batch culture of *Bacillus sphaericus*2362. *Biotechnology Letters*, Vol. 20 (2): 165-168.

- SCHNEPF E., CRICKMORE N., VAN RIE J., LERECLUS D., BAUM J., FEITELSON J., ZEIGLER D.R, DEAN D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol. 62: 775-806.
- SELINGER L.B., DAWSON P.S.S., KHACHATOURIANS G.G., 1988. Behaviour of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* under continuous phase cultivation in a cyclone fermentor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 28: 247-253.
- SMIRNOFF W.A., 1991. Réflexions à propos de la lutte biologique contre les insectes nuisibles, *La lutte anti-acridienne*, Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, pp. 279-287.
- STARZAK M., BAJPAI R.K., 1991. A structured model for vegetative growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 28/29: 699-718.
- STANBURY P. F., A. WHITAKER, AND S. J. HALL. 1995. Principles of Fermentation Technology. 2d ed. New York: Elsevier Science Ltd.
- STRIZHOV N., KELLER M., MATHUR J., KONCZ-KALMAN Z., BOSCH D., PRUDOVSKY E., SCHELL J., SNEH B., KONCZ C., ZILBERSTEIN A., 1996. A synthetic CryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, confers spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93: 15012-15017.
- TIRADO-MONTIEL M.L., 1997. Utilisation des boues des usines de traitement comme moyen alternatif pour la production de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*, Thèse de doctorat, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.
- TIRADO-MONTIEL M.L., TYAGI R.D., VALERO J.R., 2001. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using waste materials, In Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products 2<sup>nd</sup> ed., Ed. A.M. Martin, pp. 480-516. International Thomson publishing, Great Britain.
- TYAGI R.D., FOKO V.S., BARNABE S., VIDYARTHİ A.S., VALERO J.R., 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material. *Water Science and Technology*, Vol. 46, No. 10: 247-254.
- VALERO J.R., MOHAMMEDI S., PAYNE N.J., TYAGI R.D., 1999. Microbial control of defoliating forest insects. *Recent Res. Devel. Microbiology*, Vol. 3: 455-464.
- VALERO J.R., 1990. Microbiologie contre tordeuse, recherches à Forêt-Canada, région du Québec. *L'Aubelle*, pp. 12-15.
- VALLEJO F., GONZALEZ A., POSADA A., RESTREPO A., ORDUZ S., 1999. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed batch culture. *Biotechnology Techniques*, Vol. 13: 279-281.

- VAN FRANKENHUYZEN K., 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J., Bailey et S. Higgs (eds), *Bacillus thuringiensis*, an environmental Biopesticide: theory and Practice. John Wiley & Sons, New York, pp. 1-35.
- VAN RIE J., VAN MELLAERT H., PEFEROEN M., 1992. Mechanism of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plodia interpunctella* and *Plutella xylostella*. Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects, MULLI C.A., SCOTT J.G., Ed., American Chemical Society, Washington, DC.
- VEGA O.F.L., 1999. A review of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production and use in Cuba. *Biocontrol News and Information*, Vol. 20, No. 1: 47N-48N.
- VIDYARTHI A.S., DESROSIERS M., TYAGI R.D., VALERO J.R., 2000. Foam control in biopesticides production from sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25: 86-92.
- VIDYARTHI A.S., TYAGI R.D., VALERO 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(10): 253-260.
- VIDYARTHI A.S., TYAGI R.D., VALERO J.R., SURAMPALLI R.Y., 2002. Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, Vol. 36: 4850-4860.
- VORA D., SETHNA Y.I., 1999. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* in oil seed extract medi containing cystine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 15: 747-749
- WAKISAKA Y., MASAKI E., NISHIMOTO Y., 1982. Formation of crystalline δ-endotoxin or poly-β-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 43: 1473-1480.
- WHALON M.E., WINGERD B.A., 2003. Bt: Mode of Action and Use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, Vol. 54: 200–211.
- YANG X.M., WANG S.S., 2000. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 31: 71-76.
- YASEMIN I., BULENT I., OZCENGIZ G, 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. *Research in Microbiology*, Vol. 153: 599–604.
- YUDINA T.G., SALAMAKHA O.V., OLEKHNOVICH E.V., ROGATYKH N.P., EGOROV N.S., 1993. Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, Vol. 61: 402-407.

- ZOUARI N., ACHOUR O., JAOUA S., 2002a. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 77: 877-882.
- ZOUARI N., BEN SIK ALI S. JAOUA S., 2002b. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 31: 411-418.
- ZOUARI N., JAOUA S., 1999a. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, tween 80 and acetate on delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23: 497-502.
- ZOUARI N., JAOUA S., 1999b. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 25: 364-371.
- ZOUARI N., DHOUIB A., ELLOUZ R., JAOUA S., 1998. Nutritional requiremens of strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and use of gruel hydrolysate for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 69: 41-52.

## **PRÉSENTATION DES ARTICLES SERVANT DE CORPS À LA THÈSE**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche ambitieux entrepris depuis une dizaine d'années. Il consiste à mettre au point un procédé de production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Les résultats obtenus sont forts encourageant et démontrent le potentiel commercial d'une telle innovation. Ce travail de recherche a pour objet principal de concevoir une stratégie opérationnelle à grande échelle, dernière étape clé avant la formulation et la commercialisation du produit.

La présente thèse est rédigée sous la forme de six articles scientifiques en impression et soumis à des revues (avec comité de lecture) spécialisées dans le domaine des biotechnologies environnementales. Ces publications ont été réunies en trois chapitres afin de présenter notre travail de façon cohérente. Une première partie est consacrée à la mise à échelle du procédé. Dans la deuxième, trois stratégies permettant d'améliorer le potentiel entomotoxique du produit final sont développées. Enfin, la troisième partie propose d'identifier une corrélation entre le potentiel entomotoxique et l'activité protéolytique.

### **1. Mise à l'échelle du procédé de production de Bt dans les boues d'épuration**

La mise à échelle vise à transposer un procédé réalisé en laboratoire à un niveau permettant d'envisager sa commercialisation. Elle s'accompagne d'une augmentation du volume de fermentation qui n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal. En effet, plus la taille du fermenteur augmente, plus les performances par unité de volume diminuent. L'objectif est donc d'identifier les meilleures conditions et procédures opérationnelles pour s'assurer que l'effet des différents paramètres reste le même pour toutes les expériences, quelle que soit l'échelle à laquelle elles sont réalisées. L'approche traditionnelle pour la mise à échelle est basée sur la théorie des modèles et sur le principe de similarité.

Le passage de la phase des essais en laboratoire au stade de l'exploitation industrielle est déterminant pour la réussite du procédé de production de Bt dans les biosolides municipaux. Ce dernier doit s'effectuer dans un laps de temps acceptable, avec les ressources appropriées et déboucher sur une industrie qui respecte les impératifs de performance en matière de coût, de fiabilité et de viabilité. Les résultats obtenus en erlen meyer ou en bioréacteur 15 litres étant forts prometteurs, on estime qu'il est possible d'obtenir une amélioration significative du produit final suite aux divers essais d'optimisation et de stratégies de production. Il serait donc intéressant d'établir la reproductibilité de ces résultats à grande échelle (fermenteur 150 litres). Les résultats de reproductibilité sont vitaux pour une analyse systématique de l'influence des paramètres du processus sur les performances de la fermentation.

Ce chapitre est scindé en deux articles. Le premier intitulé « *Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material* » cherche à vérifier la reproductibilité des résultats obtenus en fioles et en bioréacteur de laboratoire à l'échelle pilote. Il s'agit d'une part d'obtenir des résultats comparables, voire meilleurs à plus grande échelle, et d'autre part de déterminer les facteurs clés affectant la productivité lors de l'extrapolation industrielle du procédé. Le second intitulé « *Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into Bacillus thuringiensis based biopesticides in a pilot plant fermentor* » compare les performances enregistrées lors de la fermentation de Bt dans divers milieux de culture en bioréacteur 150L.

### **1.1 Mise à l'échelle du procédé de production de Biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation**

Un des aspects importants du "Scale up" est le transfert d'oxygène. En effet, avec l'augmentation de volume, sa diffusion peut être le facteur limitant du procédé. Le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) est un outil pratique pour la mise à l'échelle. Cet outil a été adopté lors de la mise à échelle de notre procédé.

Ce chapitre a pour objectif d'établir la reproductibilité des résultats obtenus en fioles et en fermenteur 15 litres à l'échelle pilote (fermenteur 150 litres). Il y ait démontré qu'il est possible d'assurer de bonnes conditions d'oxygénation dans un fermenteur à grande capacité. Dans des conditions contrôlées de pH et d'oxygène, le compte de cellules viables augmente de 38 à 55 % par rapport à celui obtenu en fioles. De même, que l'essai soit réalisé en fermenteur de

laboratoire ou en fermenteur pilote ( $5,3\text{--}5,5 \times 10^8$  ufc/mL) le compte de spore s'accroît de 25 %. À l'échelle pilote, une amélioration de 25 % du potentiel entomotoxique est constatée. Les résultats de l'activité protéolytique maximale obtenus en conditions contrôlées, à l'échelle laboratoire et pilote, sont respectivement de 2 à 4 fois supérieur à ceux observés en fiole. La plus haute activité protéolytique est observée à l'échelle pilote (4,1 UI/mL) en raison d'un meilleur transfert d'oxygène. En conclusion, la mise à échelle du procédé de fermentation de Bt dans les boues d'épuration a été réalisée avec succès et résulte d'une production simultanée de nombreuses protéines toxiques et de protéases alcalines.

## **1.2 Bioconversion des eaux usées industrielles et des boues d'épuration en biopesticide à base de Bt, en fermenteur pilote**

Six milieux de culture différents ont été testés à l'échelle pilote. Il s'agit tout d'abord de trois types de boues secondaires provenant des stations de traitement des eaux usées de la communauté urbaine de Québec (CUQS), de Jonquière (JQS) et de Black Lake (BLS), de deux types d'effluents provenant des industries de transformation de l'amidon (SWW) et d'abattoirs (SHWW), et enfin d'un milieu semi-synthétique à base de farine de soja qui sert de témoin. Les conditions opératoires ont été définies à partir de celles réalisées à l'échelle laboratoire (bioréacteur 15L).

Les résultats obtenus révèlent que le potentiel entomotoxique de Bt dans les différentes boues secondaires (JQS:  $12 \times 10^9$  SBU/L, CUQS:  $13 \times 10^9$  SBU/L et BLS:  $16 \times 10^9$  SBU/L) et SWW ( $18 \times 10^9$  SBU/L) est plus élevé que celui obtenu dans le milieu semi-synthétique à base de farine de soja ( $10 \times 10^9$  SBU/L). Les variations de performances (croissance, sporulation, activité protéolytique et potentiel entomotoxique) observées entre les trois types de boues sont directement liées à la disponibilité et à la complexité des protéines et des carbohydrates qui varient suivant l'origine des boues et de leur méthode de génération.

Une haute activité protéolytique est obtenue dans les boues secondaires de la CUQ (4,1 UI/ml) en raison d'une grande concentration de protéines complexes et plus spécifiquement de quantités élevées de matières en suspension. En revanche, les grandes quantités de carbohydrates dans SWW entravent la production des protéases. Les plus faibles taux de croissance et

d'entomotoxicité ont été obtenus dans SHWW à cause de la faible disponibilité des sources de carbone et d'azote.

## **2. Stratégies développées pour l'amélioration du potentiel entomotoxique**

L'optimisation des divers paramètres de fermentation (température, contrôle de pH, agitation, aération et  $K_{La}$ ), ainsi que l'optimisation du milieu de culture (physiologie, volume et âge de l'inoculum, la concentration de matière en suspension, le ratio C/N et les divers pré-traitements sur les boues) ont permis d'obtenir des progrès significatifs dans les domaines de l'efficacité de la méthode de fermentation et de l'entomotoxicité du bouillon de culture final. Toutefois, ces améliorations demeurent insuffisantes pour juger de l'efficacité industrielle de la méthode et de la capacité concurrentielle du produit. Dans le présent chapitre, trois stratégies de production ont été développées afin d'améliorer le potentiel entomotoxique. Ces stratégies ont fait l'objet de trois publications. Dans la première intitulée « *Production of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki by batch and fed-batch culture using sewage sludge as a raw material* », nous avons procédé à un mode de culture en mode expansé (*fed batch*). La deuxième publication intitulée « *Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of Bacillus thuringiensis using Different Raw Materials* » vise à maintenir la neutralité durant la fermentation par ajout d'acide acétique et d'hydroxyde d'ammonium qui offrent des sources supplémentaires de carbone et d'azote, bénéfiques pour la production de Bt. Dans la troisième intitulée « *Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by Bacillus thuringiensis var. kurstaki* », deux pré-traitements distincts ont été réalisés sur les boues secondaires afin d'augmenter la disponibilité et l'accessibilité des éléments facilement assimilables.

### **2.1 Production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* en mode de culture batch et fed batch, en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation**

Les cultures discontinues à apport contrôlé de substrat (*fed batch*) ont été largement mises à profit dans la production de biopesticides. Ce mode de culture permet d'améliorer l'entomotoxicité et de réduire les coûts de production. La complexité de cette technique réside dans le développement d'une stratégie d'alimentation appropriée(*proper feed rate*) qui pourrait améliorer le potentiel entomotoxique sans compromettre la croissance de la bactérie. Pour ce faire divers essais d'optimisation ont été accomplis (Annexe 1). Dans cet article *Bacillus*

*thuringiensis* subsp. *kurstaki* a été produit dans les boues d'épuration en mode de culture batch et expansé (*fed batch*). Une simple stratégie d'alimentation (2 ajouts) se basant sur la mesure de l'oxygène dissous, a été développée. Elle a permis d'établir qu'en changeant de mode de culture batch en fed batch, la concentration maximale de spores est augmentée de  $5,62 \times 10^8$  à  $8,6 \times 10^8$  ufc/mL, et résulte en une amélioration du potentiel entomotoxique de 38 %. Une entomotoxicité élevée a été obtenue dans les boues à faible compte de spores, contrairement au milieu synthétique où nous enregistrons des comptes de spores élevés contre une entomotoxicité moindre.

## **2.2 Influence du contrôle du pH sur le potentiel entomotoxique de *Bacillus thuringiensis* en utilisant divers substrats de fermentation**

Dans cette étude, l'hydroxyde d'ammonium et l'acide acétique ont été utilisés comme agents neutralisants durant la fermentation de *Bacillus thuringiensis* en utilisant comme substrat de fermentation deux boues secondaires provenant de deux stations d'épuration d'eaux usées municipales différentes (CUQS et JQS) et un milieu synthétique à base de farine de soja. Indépendamment du milieu de culture, une augmentation significative de compte de cellules et de spores, de l'activité protéolytique, ainsi que de l'activité insecticide a été observée, à la fin de la fermentation, lors du contrôle du pH par NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. Le compte des cellules totales s'est amélioré d'environ 17 %, 33 % et 25 % ; l'activité protéolytique a augmenté de 12 %, 33 % et 53 %; quant au compte maximal des spores, une amélioration de 28 %, 48 % et 33 % a respectivement été obtenue dans CUQS, dans JQS et dans le milieu synthétique, en remplaçant NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. Le potentiel entomotoxique a respectivement augmenté de 22 %, 21 % et 14 % dans CUQS, JQS et dans le milieu soja comparé aux résultats obtenus lors du contrôle de pH avec NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Une haute activité entomotoxique a été observée dans les boues en comparaison avec le milieu à base de soja. Cette amélioration des performances du procédé résulte de l'addition de sources de carbone et d'azote facilement assimilables qui s'opèrent à travers le contrôle de pH, ce qui stimule la production d'endotoxines dans les cristaux et permet une meilleure maturation des spores.

### **2.3 Amélioration du potentiel entomotoxique produit par *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* par pré-traitement des boues**

Les milieux de culture complexes tels que les boues d'épuration municipales nécessitent une étape de pré-traitement afin d'hydrolyser la matière organique complexe en nutriments facilement assimilables par Bt. Dans cette étude, deux types de pré-traitement sur les boues ont été réalisés avant stérilisation: une hydrolyse thermo-alcaline et un traitement oxydatif. Le pré-traitement oxydant consiste en premier lieu à acidifier des boues secondaires de la CUQ (20g/L) à pH=3 avec une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10N). On procède ensuite à une oxydation en ajoutant 0,02 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /g de boue et on laisse agiter pendant 2 heures à une température de 70°C à 100 rpm. Le pré-traitement thermo-alcalin consiste à hydrolyser par explosion de vapeur (injection directe de vapeur) des boues secondaires de la CUQ (MES=35g/L) à pH 10 et à une température de 140°C pendant 30 min. Après pré-traitement, le milieu de culture est ramené à la neutralité.

Le pré-traitement thermo-alcalin des boues se révèle être une technique efficace pour améliorer les performances du procédé de production de Bt dans les boues d'épuration. Le compte de cellules totales et celui des spores ont été respectivement augmentés de 40 % et 46 % en comparaison aux boues non pré-traitées. Le potentiel entomotoxique à la fin de la fermentation est passé de  $12,3 \times 10^9$  SBU/L dans les boues non-traitées à  $16,6 \times 10^9$  SBU/L dans les boues pré-traitées. Cette amélioration du potentiel entomotoxique pourrait être attribuée à un meilleur transfert d'oxygène en raison d'une diminution de la viscosité, et d'une amélioration de la disponibilité des nutriments suite à la solubilisation de la matière organique complexe présente dans les boues.

### **3. Corrélation entre le Potentiel entomotoxique et l'activité protéolytique**

Pour l'ensemble des expériences réalisées dans cette thèse de doctorat ainsi que les travaux antérieurs de ce projet de recherche, on remarque 3 phénomènes intéressants :

- Le compte de cellules et de spores augmente en fonction du temps et reste quasiment invariable après 24h de fermentation

- Les protéases alcalines augmentent en fonction du temps, jusqu'à atteindre un maximum vers 30-36h, puis l'activité décline.
- L'entomotoxicité augmente en fonction du temps et atteint un maximum vers la fin de la fermentation.

L'entomotoxicité élevée obtenue dans les boues d'épuration a été imputée à i) un taux spécifique de croissance élevé, ii) une haute concentration de spores et iii) une meilleure maturation de ces derniers. Toutefois, le rôle des protéases dans le potentiel entomotoxique n'a jamais fait l'objet d'une étude spécifique. De plus, il serait intéressant d'expliquer le rôle des protéases sur l'entomotoxicité et ainsi établir une corrélation qui permettrait d'évaluer rapidement et indirectement l'entomotoxicité et donc d'éviter les bioessais longs et laborieux.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé « *Protease Synthesis and Entomotoxicity Potency in Bacillus thuringiensis var. kurstaki using sludge as a raw material* ». Dans cette étude le biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été produit à l'échelle laboratoire dans des boues à différentes concentrations de matières en suspension (15, 20 et 25g/L). Le compte de cellules et de spores, l'activité protéolytique ainsi que le potentiel entomotoxique augmentent proportionnellement avec la concentration de matières en suspension dans les boues. Durant la fermentation, l'activité protéolytique augmente en fonction du temps, toutefois après avoir atteint un pic vers 36h, elle décroît. Indépendamment de la concentration de matières en suspension, et jusqu'au pic, i) l'activité protéolytique croît de façon exponentielle avec le compte de cellules totales, et ii) le potentiel entomotoxique augmente de façon linéaire avec l'activité protéolytique. Par ailleurs, une relation exponentielle a été établie entre le potentiel entomotoxique et la concentration de spores. Toutes ces corrélations ont été testées avec un modèle de régression et sont hautement significatives.

A la lumière des résultats obtenus dans ce travail de recherche, nous pouvons conclure que l'ensemble des stratégies développées montre clairement qu'il est possible d'améliorer l'entomotoxicité du produit final. Ces améliorations permettent de réduire de réduire les coûts de production et donc d'augmenter la rentabilité du procédé. La relation entre le potentiel entomotoxique et l'activité protéolytique pourrait s'avérer un outil utile et rapide pour évaluer indirectement le potentiel du bouillon de culture final.

**CHAPITRE 2: MISE À L'ÉCHELLE DU PROCÉDÉ DE  
PRODUCTION DE BT DANS LES BOUES D'ÉPURATION**



## **Partie I**

### **Scale-up of Biopesticide Production Process Using Wastewater Sludge as a Raw Material**

**A.Yezza, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, J.M. Smith<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

*Journal of industrial Microbiology and Biotechnology. In Press*



## Mise à l'échelle du procédé de production de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation

### Résumé

Cette étude a pour objectif d'établir la reproductibilité des résultats obtenus en fioles et en fermenteur de 15 litres à l'échelle pilote (fermenteur de 150 litres). En effet, les résultats de reproductibilité sont vitaux pour une analyse systématique de l'influence des paramètres du processus sur les performances de la fermentation à grande échelle.

Les résultats obtenus démontrent qu'il est possible d'assurer de bonnes conditions d'oxygénation dans un fermenteur à grande capacité. En fermenteur, le compte de cellules viables augmenta de 38 à 55% par rapport à celui obtenu en fioles. De même, le compte de spore s'est accru de 25%, que l'essai soit réalisé en fermenteur de laboratoire ou en fermenteur pilote ( $5,3\text{-}5,5 \times 10^8$  UFC/mL). À l'échelle pilote, une amélioration de 25% du potentiel entomotoxique fut constatée. Les résultats de l'activité protéolytique maximale obtenus en conditions contrôlées, aux échelles laboratoire et pilote, furent, respectivement de 2 à 4 fois supérieurs à ceux observés en fiole. La plus haute activité protéolytique fut obtenue à l'échelle pilote (4,1 UI/mL) en raison d'un meilleur transfert d'oxygène. En conclusion, la mise à échelle du procédé de fermentation de Bt dans les boues d'épuration a été réalisée avec succès et résulta en une production simultanée de nombreuses protéines toxiques et de protéases alcalines.

**Mots clés:** Biopesticides, *Bacillus thuringiensis*, Boues d'épuration, Mise à l'échelle, sporulation, Entomotoxicité, activité protéolytique.

## **Abstract**

Studies were conducted on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides to ascertain the performance of the process in shake flask and two geometrically similar fermentors (15L and 150L) utilizing wastewater sludge as a raw material. The results showed that it was possible to achieve better oxygen transfer in the larger capacity fermentor. Viable cells count increased by 38 to 55% in bioreactor compared to shake flask. As for spores count, an increase of 25% was observed while going from shake flask to fermentor experiments. Spores count was unchanged in bench (15L) and pilot scale (5.3-5.5 E+08 CFU/mL) (150L). An improvement of 25% of the entomotoxicity potential was obtained at pilot scale. Protease activity increased by 2 to 4 times at bench and pilot scale respectively compared to the maximum activity obtained in shake flask. The maximum protease activity was obtained in pilot scale (4.1 IU/mL) due to better oxygen transfer. The Bt fermentation process using sludge as raw material was successfully scaled up and resulted in high productivity for toxin protein yield and a high protease activity.

**Keywords:** Biopesticides, *Bacillus thuringiensis*, Wastewater sludge, Scale-up, Sporulation, Entomotoxicity, Proteolytic Activity.

## 1. INTRODUCTION

The production of Bt based biopesticides using wastewater sludge as a raw material was successfully achieved in our laboratory [20, 25, 28, 29, 32, 33]. All these studies were conducted in shake flasks and/or bench scale bioreactor (10L working volume). However, in order to develop suitable technology for eventual commercialization, it was essential to carry out tests in pilot fermentor.

The purpose of scale-up is the selection of design conditions and operational procedures to ensure that the effect of different variables on the process is the same in units of different size. The final objective is to bring a fermentation process to its economic fruition, and therefore the technical aspects are important in so far as they can be translated into economic indicators such as yield, productivity, capital investment and unit production cost, whose combined evaluation eventually decides upon the economic viability of the processes. Up-scaling fermentation process from a lab-scale unit to a commercial one is a challenge due to the difficulty in assessing the factors affecting the scale-up process during the cultivation. It is well known that at large scale microorganisms are more susceptible to environmental variables, such as pH, temperature, dissolved oxygen and composition of the raw material. These variables have a substantial effect on the cell growth and the metabolite production [13]. Also, particular attention must be paid for oxygen transfer rate and heat transfer rate. It is critical to make sure that at large-scale cultivation the Bt process has adequate oxygen transfer capacity and cooling capacity [35]. Other operational factors can and do change in scale-up, such as quality of mixing, shear stress, selection of cheaper media, foam control, physiological state of the inoculum, and sterilization of culture medium [14].

To ensure successful scale-up of fermentation processes, it was essential to determine the appropriate scale-up criteria and the factors that reflect the critical parameters of the fermentation process. Bt fermentation is a strong aerobic fermentation. The most utilized criteria for scale-up of aerobic fermentations maintaining geometric similarity are based on empirical or semi-empirical equations, which correlate the volumetric oxygen transfer coefficient ( $K_{La}$ ) and the volumetric airflow rate per unit working volume ( $Q/V$ ). Geometric similarities are the ratio between liquid height and vessel diameter or the ratio between impeller diameter and vessel

diameter. Geometric similarity is important from the practical point of view, in that it simplifies the prediction of fermentor performance on the large scale [16].

The primary aim of our investigation was to ensure reproduction of results obtained at bench scale (15L) and pilot scale (150L). Reproducible results are vital for a systematic analysis of the influence of process development parameters on fermentation performance at large scale.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Bacillus thuringiensis* strain

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Btk) was obtained from ATCC and maintained in the Canadian Forestry Service Lab (Ste-Foy). An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar slants plates [TSA: 3.0% Tryptic Soya Broth (Difco)+1.5% Bacto- Agar (Difco)], incubating at 30°C for 48 hr and then storing at 4°C for future use.

### 2.2. Inoculum preparation

The inoculum was prepared in two steps as reported by Lachhab *et al.* [20]. Aliquots of bacteria from the slant were used to inoculate 500mL Erlenmeyer flask containing 100mL of sterilized TSB (tryptic soy broth, 3% v/v, Difco). After 8-12 h incubation at 30 °C under shaking conditions (250 rpm), a 2% (v/v) of this broth was used as seed culture to inoculate Erlenmeyer flask containing the same medium (sludge in this case) as used for Bt fermentation. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 30°C with an agitation speed 250 rpm for about 10-14 h. All the media used for inoculum preparation were adjusted to pH 7 before autoclaving. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells (in exponential phase) of the pre-culture was transferred to the experimental shake flask and fermentor.

### 2.3. Raw material

Secondary sludge from wastewater treatment plant; namely, Communauté Urbaine du Quebec (CUQS) was used (Table 1). The sludge was settled to increase the solids concentration to 25g/l. The physical characteristics of sewage sludge such as total sludge solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to the standard methods [4]. Chemical characteristics of sludge like total carbon and nitrogen, were

analysed with NA 1500-NCS analyser (Carlo Erba Instrument). Other chemical components in sludge like ammonia nitrogen, total phosphorus and phosphate as PO<sub>4</sub> were analysed by Technicon Analyser II (Technicon Instruments Corporation, New York). Metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Mg and Ca) concentrations were analysed by atomic absorption spectrometer Spectra AA-20 (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia).

## 2.4. Fermentation procedure

### *Shake flask experiment*

A 2% (v/v) inoculum of the pre-culture was used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 100mL sterilized sludge. The flask was then incubated at 30°C±1 in shaking incubator at 250 rpm for 48h.

### *Bench and pilot scale fermentor*

Fermentations were carried out in two stirred tank bioreactor, bench and pilot scale with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. Details about the dimensions of both fermentors are summarized in Table 2. The computer program (Fix 5.5, Intellution, USA) used allowed automatic set-point control and registration of all stated parameters.

Before each sterilisation cycle, the pH-electrode was calibrated using buffer of pH 7 and 4 (VWR-Canada). The dissolved oxygen (DO) probe was calibrated to zero (with 1 N sodium sulphite solution) and 100% (saturated with air). Sludge was filled in the fermentor and polypropylene glycol (PPG, Sigma-Canada) (0.1% v/v) solution was added to control the foam during sterilization. The fermentor was then sterilised *in situ* at 121°C for 30 min. After sterilisation fermentor was cooled to 30°C. The DO probe was recalibrated to zero by sparging N<sub>2</sub> gas and 100% saturation by sparging air and at maximum agitation rate (150 rpm for pilot scale fermentor and 500 rpm for bench scale fermentor). The fermentor was then inoculated (2% v/v inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. Fermentations were carried out under constant volumetric airflow rate per unit volume (Q/V=0,3vvm). The agitation speed was varied in order to keep the dissolved oxygen values above 20% of saturation, which ensured the oxygen concentration above the critical level [6]. It was found in our study that if oxygen concentration

was allowed to decrease below 20-24% of saturation, entomotoxicity (Tx) value was markedly reduced (data not reported). The temperature was controlled at  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  by circulating hot or cold water through the jacket using a circulation pump. The pH was controlled at  $7.0 \pm 0.1$  using either 4N Na OH or 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> through computer-controlled peristaltic pumps. Foaming during the fermentation was controlled using both mechanical foam breaker and chemical antifoam agent (PPG); 1:10 aqueous emulsion was used as a chemical antifoam agent. Dissolved oxygen and pH were continuously monitored by means of polarographic dissolved oxygen probe (Mettler Toledo, USA) and pH sensor (Mettler Toledo, USA) respectively.

Samples were collected periodically to monitor the changes in Viable Cell (VC), Spore Count (SC), Proteolytic Activity (PA) and Entomotoxicity (Tx).

### **2.5. Estimation of cell and spore count**

To determine viable cells or total viable cell count (VC) and spores count (SC) the samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85%. NaCl). The appropriately diluted samples (0.1mL) were plated on TSA plates and incubated at  $30^{\circ}\text{C}$  for 24 h to form fully developed colonies. For spore count (SC), the appropriately diluted samples were heated in a silicone bath at  $80^{\circ}\text{C}$  for 10 min and then chilled on ice for 5 min [31]. This heat/cold shock lysed the vegetative cells and liberated those spores already formed in the bacterial cells [34]. The titre of VC and SC were estimated by counting colonies grown on nutrition media. For all counts, average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30–300 colonies were counted per plate. The results were expressed in colony forming units per mL (CFU/mL). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated in three different plates and the colonies were counted and the standard deviation was calculated. The standard deviation thus calculated was 6%.

### **2.6. Bioassay**

The entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality to eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray

76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). This product contains a mixture of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* at a potency of  $20.1 \times 10^9$  IU/L (International Unit) measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented sludge samples using spruce budworm larvae and cabbage looper. It was found that (SBU) reported in this research was 20-25% higher than (IU).

The bioassays were carried out using the diet incorporation method [7]. In this technique 1.5mL of serially decimal diluted sample was mixed into 30mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to correct the mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The standard deviation for entomotoxicity measurement was less than 5%.

## 2.7. Proteolytic activity assay

Proteolytic activity (PA) was determined according to Kunitz [19] with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 7650xg for 20 min at 4°C. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer pH 8.2. Alkaline protease activity was assayed by incubating 1mL of properly diluted enzyme solution with 5mL of casein during 10 minutes at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples as well as the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275nm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution (Subtilisin Carlsberg, Sigma-Aldrich inc, Canada) of known activity in the same way and under the same conditions. One proteolytic activity unit was defined as the amount of enzyme preparation required to

liberate 1 µmole (181µg) of tyrosine from casein per minute under pH 8.2 at 37°C. The statistical treatment of the results showed maximum deviations of 5%.

## **2.8. Determination of K<sub>La</sub>, OUR and OTR**

Volumetric oxygen transfer coefficient (K<sub>La</sub>) was measured in bench and pilot plant fermentor. In this work the measurement of K<sub>La</sub> is based on the dynamic gassing out method [2]. K<sub>La</sub> was determined during fermentation at the same time the samples were taken.

During batch fermentation, the mass balance of the DO concentrations in the cultivation medium

was the following:  $\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$

OTR, represents the oxygen transfer rate:  $OTR = K_{La}(C^* - C_L)$

OUR, represents the oxygen uptake rate:  $OUR = Q_{O_2} X$

Oxygen uptake rate was measured by shutting off airflow:  $\frac{dC_L}{dt} = -Q_{O_2} X$

K<sub>L</sub>: Liquid phase mass transfer coefficient

a : Gas liquid interfacial area

K<sub>La</sub> : Volumetric oxygen transfer coefficient

C<sup>\*</sup> : Saturated oxygen concentration

C<sub>L</sub>: Dissolved oxygen concentration in the medium

Oxygen concentration in the fermentation broth was converted from % air saturation to mmol O<sub>2</sub>/L as follows: the DO electrode was calibrated in medium at 30°C and then transferred to air-saturated distilled water at known temperature and ambient pressure. This reading was used, with the known saturation concentration of oxygen in distilled water (0.07559 mmol/L at 30°C) (100%), to estimate the saturation concentration of oxygen in the cultivation media at 30 °C.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Enhancement in viable cell and spore count**

Profiles of viable cells and spores counts, entomotoxicity potential and proteolytic activity are almost similar for shake flask, bench and pilot scale fermentor (Figures 1-3). A short lag phase was observed in shake flask as well as bench and pilot fermentors, this could be attributed to good adaptation of Bt in the pre-culture stage. The pre-culture stage allowed the bacteria to

synthesize specific enzymes for the degradation of the organic matter present in sludge, and used the generated energy for cellular development [20].

Irrespective of the scale of fermentation, exponential growth occurred during the first 9 to 10h (Figures 1-3), the maximum values of specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) based on total viable cell count were  $0.354\text{h}^{-1}$ ,  $0.409\text{h}^{-1}$  and  $0.569\text{h}^{-1}$  in shake flask, bench scale fermentor and in pilot scale fermentor respectively (Table 3). Figs 1-3 also show that it is difficult to demarcate vegetative growth from spore production. Spore concentration started to increase from zero time. Presence of spores in the sample drawn just after inoculation (at zero time) indicated that there were spores in the inoculum. However, increase in total viable cell count (spore and vegetative cells) showed that active growth continued until 9-10 hrs followed by a slow growth (Fig 1-3). Exponential growth persisted for about 6 hrs. The viable cells count increased by 38 to 55% in bioreactor compared to shake flask (Table 3). The reason for this increase might be due to comparatively high  $\mu_{\max}$  value and controlled conditions of pH and DO in bioreactors. The higher  $\mu_{\max}$  in fermentor could be attributed to better capacity of oxygenation of the medium in bench and pilot scale, which agrees with the conclusions of other workers [1, 37] working with gruel and molasses as raw material respectively.

As for spores count, an increase of about 35% was observed while going from shake flask to fermentors experiments (Table 3). It is important to point out that the sporulation was not affected by the change of scale under controlled condition. Spores count was approximately the same in bench and pilot scale ( $5.3\text{-}5.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ); this could be due to non-limiting oxygen conditions.

### **3.2. Enhancement of entomotoxicity potential**

Entomotoxicity potential (Tx) was measured from 12h of growth and showed an almost linear increase with fermentation time. Early spore production (Figs 1-3) resulted in concomitant increase in Tx value irrespective of scale. Tx value was not measured before 12 hrs, however, there could be production of Tx in the medium before 12 hrs along with spore production. Tx obtained at the end of active growth (12h) was substantial, 50% of maximum (at the end of fermentation) in shake flask and bench scale fermentor and 69% in pilot scale fermentor (Figure 1

to 3). This is contrary to the findings of many authors who stated that during exponential growth, cells do not contain the crystal toxin antigen and are nontoxic [21]. One of the reasons for this discrepancy could be the slow Bt growth in sludge medium that might have helped the spores to mature properly and provided sufficient time for the formation of endotoxin before cell lysis occurred [33]. Aronson [5] also showed that a crystal toxin antigen appears in the cells strictly during spore engulfment (stage III) and cortex synthesis (stage IV). This could explain the substantial Tx value obtained after 24h fermentation; Tx values were 70%, 75% and 77% in shake flask, bench scale fermentor and in pilot scale fermentor, respectively (Figures 1 to 3). The balance of Tx value appeared during rest of fermentation (24-48h) course where spore increase was not substantial.

The highest entomocidal activity was also found near the end of the cultivation, as shown in Figures 1, 2 and 3. An improvement of 30% of the entomotoxicity potential was obtained at pilot scale as compared to shake flask. In general, higher  $\mu_{\max}$  value obtained in bench and pilot fermentor (Table 3) resulted into higher viable cell, spore count and entomotoxicity as fast growing cells carry higher energy and leads to higher sporulation and Tx potencies [29, 32].

### **3.3. Proteolytic activity**

*Bacillus* are typical carrion dwellers, they are well adapted to digest varied and complex substrates. *Bacillus thuringiensis* synthesizes different types of proteases from the beginning of sporulation, required to hydrolyse complex proteins in order to satisfy its nutritional needs [8, 10].

The evolution of proteolytic activity produced at different scale is illustrated in Figures 1 to 3. The maximum proteolytic activity observed was 1.2 (24h), 2.6 (36h) and 4.1 (30h) IU/mL respectively in shake flask, bench and pilot scale fermentors. A decline in protease activity was recorded after it attained the maximum peaks at all scales. This might be due to inactivation of proteases brought by interactions with other compounds in the cultivation medium.

Protease activity increased by 2 and 3.4 times at bench and pilot scale respectively compared to the maximum activity obtained in shake flask (Table 3). This could be due to an increase of

oxygen transfer and pH control. Tyagi *et al.* [30] obtained 4 times higher proteolytic activities in fermentor than in shake flasks using sewage sludge as raw material for Bt production. Meunier [22] showed that changes of pH during growth of Bt in shake flasks experiments could inactivate proteolytic enzymes. Moreover, the maximum protease activity was obtained in pilot scale (4.1IU/mL) without affecting the production of  $\delta$ -endotoxin. These results are in line with Tyagi and co-workers [30] who showed that substantial amount of alkaline proteases as well as Bt toxins could be produced simultaneously using sludge as raw material without affecting the entomotoxicity of the final fermentor broth. Moreover, the formulation devoid of protease offers a more stable product. Therefore it is preferable to eliminate the protease in supernatant by centrifugation and use the residual solids containing Bt cells, spores and endotoxin for formulation. This will reduce the negative effect of proteases in Bt formulation and the protease in supernatant could be recovered for further use [36, 37].

### 3.4. Oxygen uptake rate, oxygen transfer rate and $K_{La}$ pattern

Profiles of  $K_{La}$ , OUR, and OTR in bench and pilot scale fermentors are presented in Figures 2 and 3, respectively. During the first stage of fermentation (first 6h of growth), a decrease in DO was noticed due to higher oxygen uptake rate brought in by active growth of Bt (exponential growth). After that, oxygen consumption rate decreased and oxygen concentration increased (10-15h of fermentation) and remained relatively constant until the end of fermentation. In wastewater sludge media,  $K_{La}$  increased in the beginning of fermentation then it fluctuated somewhat irregularly during the rest of the fermentation due to change in impeller speed and metabolite production.

Increasing the agitation and aeration rate is the traditional approach used to enhance the oxygen transfer rate. Increased agitation produces more gas dispersion, and gas dispersion produces higher oxygen transfer [23]. However, in pilot scale, even at low stirrer speed,  $K_{La}$  values were higher than in bench scale fermentor (Figures 2 and 3). This could be due to the small size of air bubbles produced due to hydrostatic pressure in pilot scale bioreactor. In fact, bubbles characteristics have been found to strongly affect the value of  $K_{La}$  [15]. Juarez and Orejas [17] also found an increase in  $K_{La}$  with decreased bubble size.

It was shown that OUR measurements were found to be a valuable parameter to visualize the different phases of Bt growth cycle during batch fermentation [9]. The peaks of  $K_{La}$ , OUR and OTR were obtained at the same time, 6 hours after the inoculation (Figures 2 and 3), than dropped sharply. The sharp decrease in  $k_{La}$ , OUR and OTR could be identified as the end of the exponential growth phase. OUR and OTR in pilot scale fermentor are higher than those in bench scale (Figures 2 and 3), and this resulted in higher specific growth rate in pilot scale (Table 3). This is in tune with the observation of Rowe *et al.* [24], who observed that the oxygen uptake rate (OUR) increased with maximum specific growth rate.

Differences in  $K_{La}$ , OUR and OTR between the two fermentor scales can be attributed to changes in the interfacial area ( $a$ ) which is affected by the volume of liquid, liquid height in the vessel, the dimensions of the fermentation vessel, bubbles size, the pattern of agitation, and the vigour of agitation.

### **3.5. Correlation between $K_{La}$ and proteolytic activity**

Oxygen transfer rate and pH are the key variables for the production of the alkaline proteases [3, 18]. Correlation has been found between the volumetric coefficient of oxygen transport and the protease activity in submerged fermentation. Oxygen transfer is enhanced at larger scales because higher superficial velocities are achieved when the dimensional ratios of the vessels are held constant [15, 27].

It is clear that the increase of oxygen transfer rate in the pilot scale fermentor increased the protease activity (Figures 2 and 3). At pilot scale fermentor, aeration was achieved by gas sparger consisting of a perforated ring located at the bottom of the reactor. This sparger supplied a smaller bubble size than the bench scale fermentor (air supply by perforated tube). The smaller bubble size could also be created through higher hydrostatic pressure in pilot scale fermentor. The benefit of small bubbles is slow rising velocities which keep air bubbles in the liquid longer, allowing more time for the oxygen to dissolve [11]. Furthermore, small air bubbles provided higher interfacial area ( $a$ ) than large air bubbles [26].

Stirrer speed could also affect the protease activity. Higher agitation rate in bench scale (300-500 rpm) compared to pilot scale (100-190 rpm), increased the oxygen transfer in the vessel, but did not improve the enzyme production. This could be due to strong shear rates, which could deteriorate the cells and hence the enzyme yield [26].

### **3.6. Process performance**

Weak performance ( $\mu_{\max}$ , VC, SC, Tx and PA) recorded in shake flasks compared to fermentor could be explained by the fact that the Bt fermentation in shake flasks present certain limitations at the level of the control of the major fermentation parameters of which are pH, oxygen transfer, considerable evaporation and a bad mixing. Humphrey [14] revealed that the cotton plug could be a limiting factor of the oxygen transfer.

It is clear that under controlled conditions of pH and dissolved oxygen, a significant enhancement in viable cells and spores count, entomotoxicity potential and proteolytic activity are observed. The differences observed between the bench and pilot-scale runs were presumably related to the mixing and flow characteristics of each fermentor. The mixing time is generally not the same in reactors of different scale [12].

Wastewater sludge contains a large quantity of proteins that results in intense foaming during exponential growth of Bt. However, an adequate control of agitation and aeration with a well optimized sludge solids concentration would avoid the problems related to the foam formation during fermentation. Higher aeration rates often encounter the problem of excessive foaming specially during the exponential growth of Bt using sludge as raw material [31].

For the large scale production of Bt, the supply of raw material is not problematic as wastewater sludge is available abundantly. However, use of this complex medium is characterized by an inconsistent and unknown composition especially at the level of the availability of assimilable nitrogen and carbon sources, which may lead to a great variability in batch to batch fermentation. However, keeping the solids concentration at optimum level of 20-25g/l [20] in the fermentor will give fairly constant process performance. The effect of variability of sludge composition on Bt growth and toxin synthesis was verified by collecting the sludge samples from CUQ wastewater

treatment plant at different time (to cover seasonal, day and night and other possible variations) for a period of one year. These samples were used to grow Bt under similar conditions in shake flask. It was found that utilising optimum suspended solids concentration 20-25g/l, the variation of Tx value was between +9% and -13% (non-published data). Another way to combat the variation in sludge characteristics and its consequences on fermentation could be the use of dewatered sludge. Dewatered sludge can be stored over a time without change in the composition. However, dewatered sludge furnished 20% lower entomotoxicity in comparison to fresh sludge at same solids concentration (25 g/L suspended solids concentration) [33].

In conclusion, the performance and the reproducibility of the process at two scales has been demonstrated. The scale-up study has confirmed the optimal conditions obtained from the small-scale optimization study. It resulted in higher entomotoxicity potential and a high protease activity. Thus, this process provides a solution of safe wastewater sludge disposal and high potency and low cost biopesticides.

### **Acknowledgements**

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STR 202047, SCF 192190-96 and Canada Research Chair). The views and opinions expressed in this article are those of authors.

### **References**

1. Abdel-Hameed A, (2001) Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. World Journal of Microbiology & Biotechnology: 17: 857-861.
2. Aiba S, Humphrey A.E, Millis N.F, (1973) Biochemical Engineering Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition, New York.
3. Anwar A, Saleemuddin M, (1997) Alkaline proteases: A review. Bioresource Technology: 64: 175-183.
4. APHA, AWWA, WPCF, (1989) Standard Methods for Examination of Waters and Wastewaters, 17th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.

5. Aronson A, (2002) Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 59: 417-425.
6. Avignone-Rossa C, Arcas J, Mignone C, (1992) *Bacillus thuringiensis*, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 8: 301-304.
7. Beegle C.C, (1990) Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin, *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, In: Hickle LA and Fitch WL (ed) *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, American Chemical Society, pp. 14-21.
8. Braun S, (2000) Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D, In Navon A and Ascher K.R.S (ed) Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses, *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, CAB International 2000, pp. 49-72.
9. Chang SW, (1993) Studies of growth conditions and estimations of oxygen uptake rate for *Bacillus thuringiensis*, University of Illinois At Urbana-Champaign, 95 pages.
10. Chu I.M, Lee C, Li T.S, (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch culture of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microbiology and Technology*: 14: 755-761.
11. Doran P.M, (1995) *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, San Diego, California.
12. Flores E.A, Perez F, De La Torre M, (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. *Journal of fermentation and Bioengineering*: 83: 561-564.
13. Hsu Y.L, Wu W.T, (2002) A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*: 11: 123–130.
14. Humphrey A, (1998) Shake flasks to fermentor: What have we learned?. *Biotechnology Progress*: 14: 3-7.
15. Jin B, Leeuwen J, Doelle H.W, Yu Q, (1999) The influence of geometry on hydrodynamic and mass transfer characteristics in an external airlift reactor for the cultivation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*: 15: 73-79.
16. Ju L.K., Chase G.G. (1992). Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering* : 8 : 49-53.

17. Juarez P, Orejas J, (2001) Oxygen transfer in a stirred reactor in laboratory scale. Latin American Applied Research: 31: 433-439.
18. Kumar C.G, Takagi H, (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint, Biotechnology Advances: 17: 561-594.
19. Kunitz M, (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol: 30: 291-310.
20. Lachhab K, Tyagi R.D, Valero J.R, (2001) Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochemistry: 37: 197-208.
21. Liu C.M, Tzeng Y.M, (2000) Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology and Bioengineering: 68: 11-17.
22. Meunier N, (1999) Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada.
23. Parakulsatid P, (2000) Utilization of microbubble dispersion to increase oxygen transfer in pilot scale baker's yeast fermentation unit. Master Science, Faculty of the Virginia, USA.
24. Rowe G. E, Margaritis A, Wei N, (2003) Specific Oxygen Uptake Rate Variations during Batch Fermentation of *Bacillus thuringiensis* Subspecies kurstaki HD. Biotechnol Prog: 19: 1439-1443.
25. Sachdeva V, Tyagi R.D, Valero J.R, (2000) Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. Water Science and Technology: 42: 211-216.
26. Sachidanadham R, Kumar I.A, Krishnan M.R, Jayaraman K, (1999) Mathematical model based estimation of volumetric oxygen transfer coefficient(s) in the production of proteolytic enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioprocess Engineering: 2: 319-322.
27. Schell D.J, Farmer J, Hamilton J, Lyons B, McMillan J.D, Saez J.C, Tholudur A, (2001) Influence of operating conditions and vessel size on oxygen transfer during cellulase production. Applied Biochemistry and Biotechnology: 91-93: 627-642.
28. Tirado-Montiel M.L, Tyagi R.D, Valero J.R, (2001) Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Research: 35: 3807-3816.

29. Tirado-Montiel M.L, Tyagi R.D, Valero J.R, Surampalli R.Y, (2003) Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material: Effect of process parameters. Water Science and Technology: 48: 239-246.
30. Tyagi R.D, Foko V.S, Barnabe S, Vidyarthi A.S, Valero J.R, (2002) Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material Water Science and Technology: 46: 247-254.
31. Vidyarthi A.S., Desrosiers M., Tyagi R.D., Valero J.R. (2000) Foam control in biopesticide production from sewage sludge. J. Ind. Microbiol. Biotechnol: 25: 86-92.
32. Vidyarthi A.S, Tyagi R.D, Valero J.R, (2001) Effect of surface-active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Science and Technology: 44: 253-260.
33. Vidyarthi A.S, Tyagi R.D, Valero J.R, Surampalli R.Y, (2002) Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Research: 36: 4850-4860.
34. Yamamoto T. (1982) Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *J. Gen.Microbiol.*: 129: 2595-2603.
35. Yang X.M, Wang S.S, (1998) Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. Biotechnology and Applied Biochemistry: 28: 95-98.
36. Zouari N, Achour O, Jaoua S, (2002) Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermentors. Journal of Chemical Technology and Biotechnology: 77: 877-882.
37. Zouari N, Jaoua S, (1999) Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* strain grown on gruel-based media. Enzyme and Microbial Technology: 25: 364–371.

**Table 1. Physical and chemical characteristics of CUQS sludge**

Characteristics	Value
<i>Physical Characteristics</i>	
Total Solids (TS) (g l <sup>-1</sup> )	29
Volatile Solids (VS) (g l <sup>-1</sup> )	19
Suspended solids (SS) (g l <sup>-1</sup> )	25
Volatile suspended solids (VSS) (g l <sup>-1</sup> )	18
pH	5.7
<i>Chemical Characteristics</i>	
Total carbon (%, dry TS)	40.4
Total nitrogen (%, dry TS)	5.25
Ammonical nitrogen (mgN/kg)	632
Total Phosphorus (mgP/kg)	10 525
Orthophosphates (mgP/kg)	5830
<i>Metals (in mg/kg)</i>	
Al <sup>3+</sup>	16 445
Ca <sup>2+</sup>	18 778
Cd	3.3
Cr	94
Cu <sup>+</sup>	271
Fe	12 727
Mg	2 556
Mn	182
K <sup>+</sup>	2563
Pb	67
Zn	551

**Table 2. Dimensions of bench and pilot scale bioreactors**

Bioreactor	Bench scale	Pilot scale
Total volume (L)	15	150
Working volume (L)	10	100
Impeller (Six blades- Rushton turbines)	3	3
Stirrer diameter, $D_i$ (m)	0.1	0.25
Tank diameter, $D_t$ (m)	0.20	0.5
$D_t / D_i$	2	2
Liquid height, $H_L$ (m)	0.3	0.75
$H_L / D_t$	1.5	1.5

**Table 3. Fermentation parameters and performance of the Bt process in different scale**

	Flask	Bench scale	Pilot scale
Agitation (rpm)	250	300-500	100-200
Aeration (vvm)	***	0.3	0.3
SS (g/l)	25	25	25
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.354	0.409	0.567
VC (48h) (CFU/mL)	4.3 E+08	5.97 E+08	6.67 E+08
SC (48h) (CFU /mL)	3.97 E+08	5.37 E+08	5.53 E+08
Tx (48h) (10 <sup>9</sup> SBU/L)	10	12	13
Max PA (IU/mL)	1.2 at 24h	2.6 at 36h	4.1 at 30h

SS: suspended solids

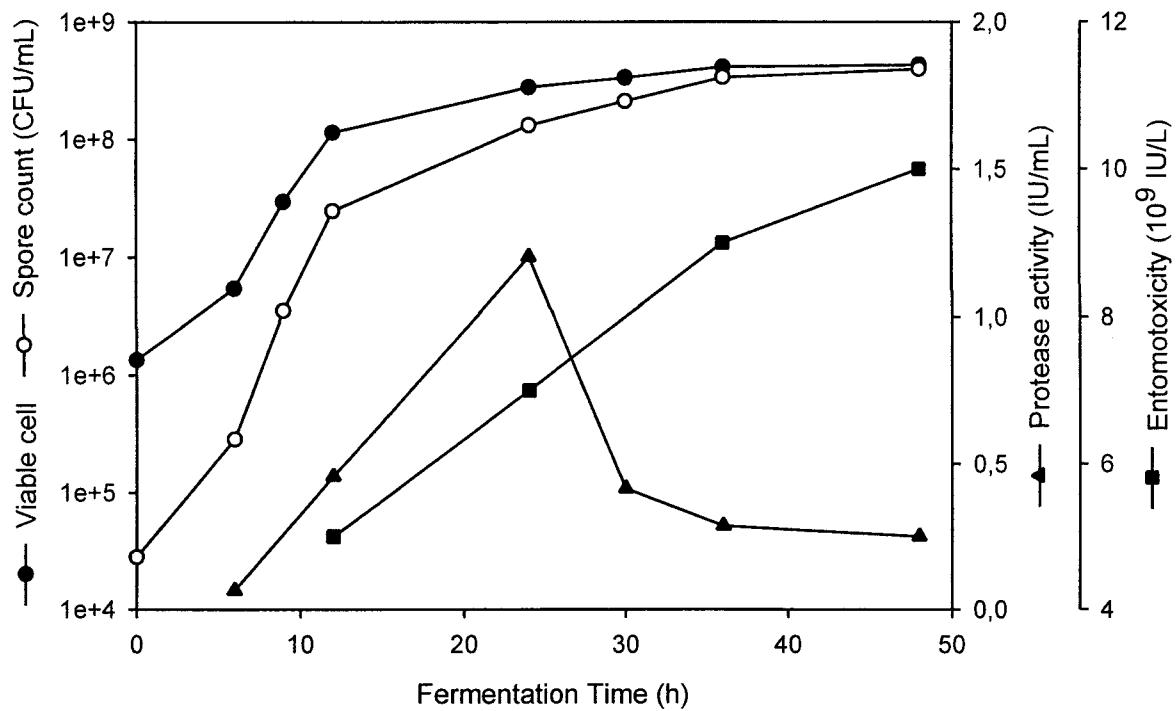
$\mu_{\max}$ : maximum specific growth rate

PA: protease activity

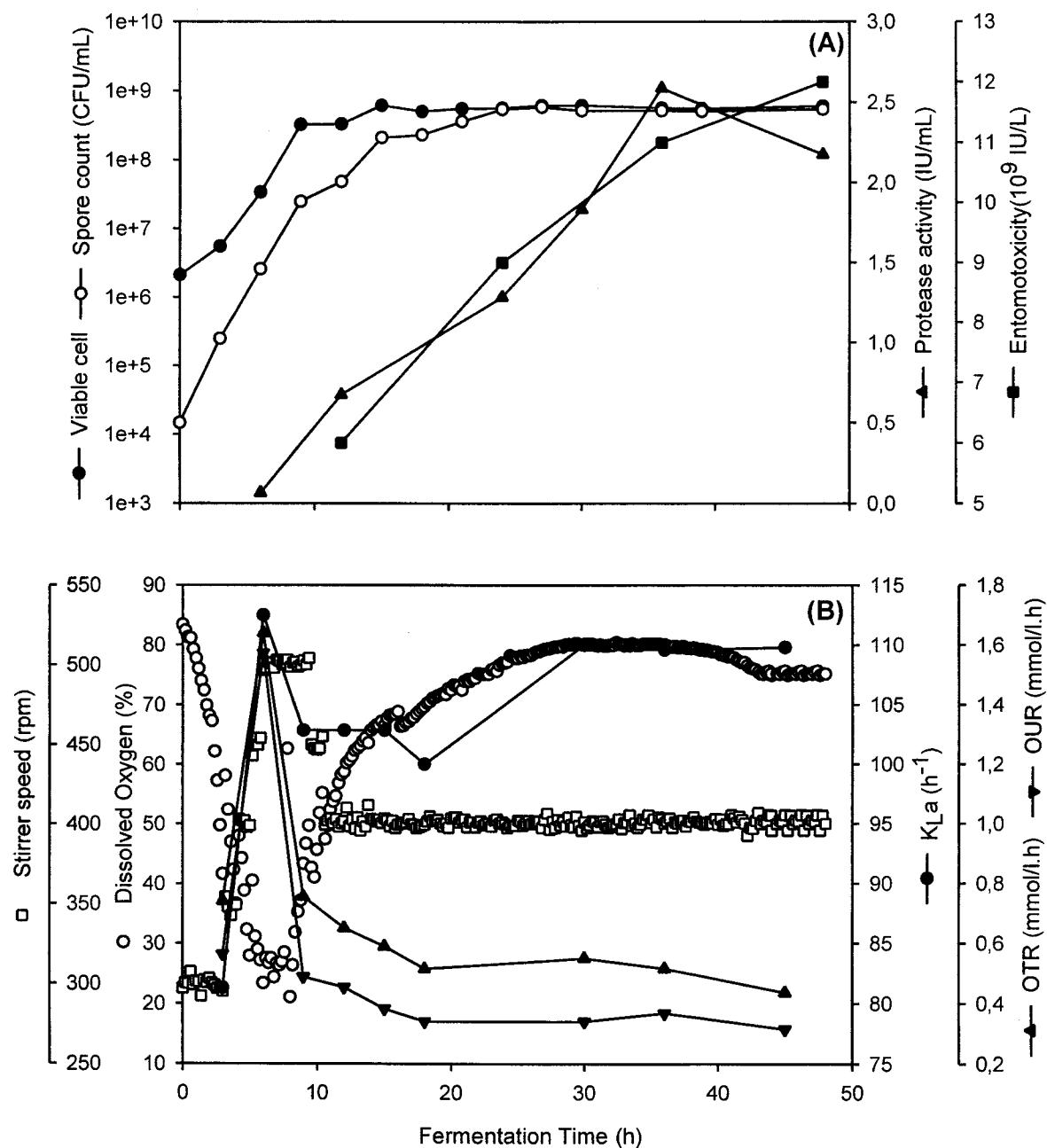
Tx: entomotoxicity

VC: total viable cell count

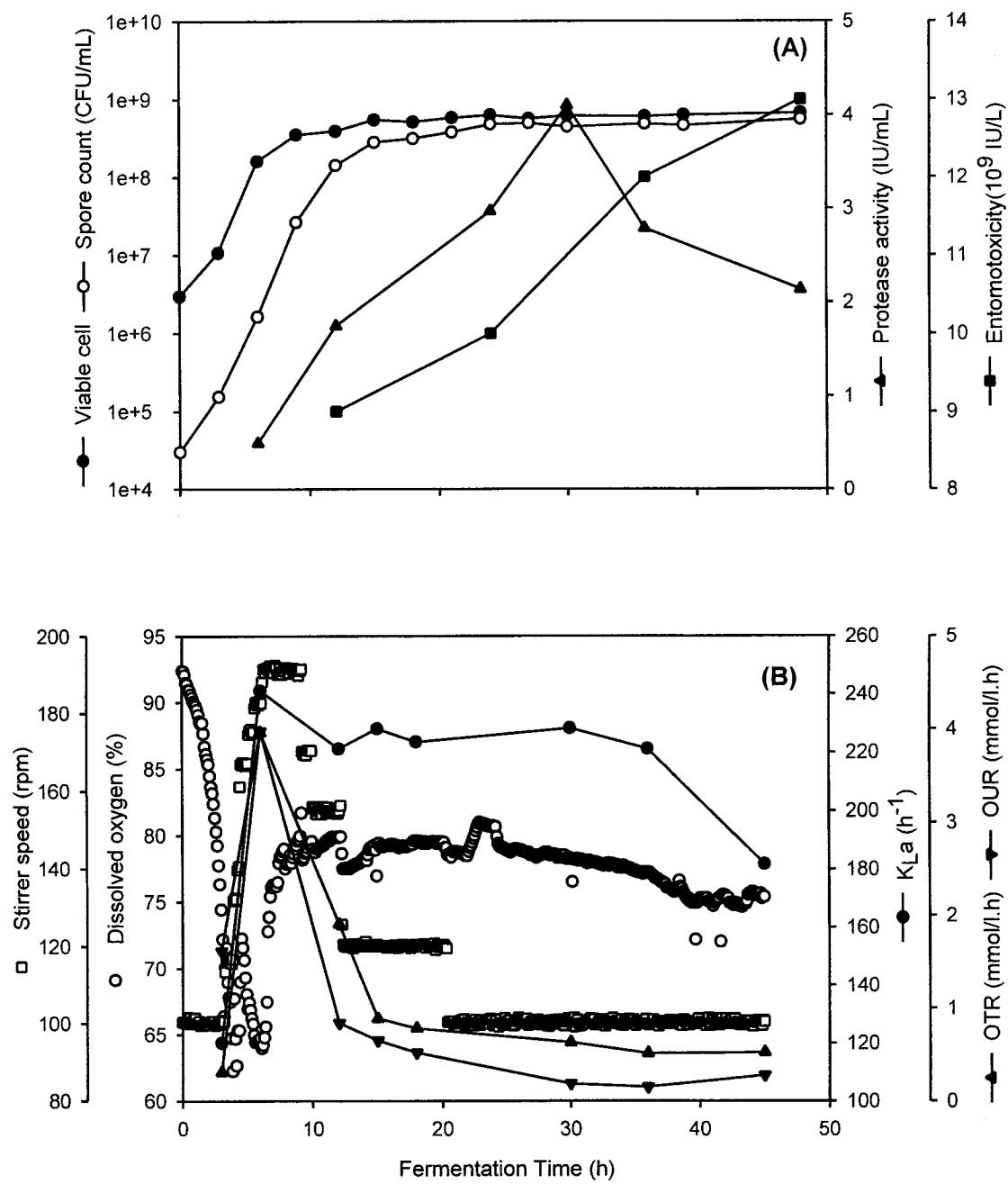
SC: spore count



**Figure 1. Evolution of viable cells and spores count, entomotoxicity and protease activity during fermentation course in shake flask**



**Figure 2. (A) Evolution of viable cells and spores count, entomotoxicity and protease activity during fermentation course. (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed,  $K_{La}$ , OTR and OUR in bench scale fermentor (10L working volume).**



**Figure 3.** (A) Evolution of viable cells and spores count, entomotoxicity and protease activity during fermentation course. (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed,  $K_{La}$ , OTR and OUR in pilot scale fermentor (100L working volume).



## **Partie II**

### **Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot plant fermentor**

**A.Yezza<sup>1</sup>, R.D. Tyagi<sup>1</sup>, J.R. Valéro<sup>1,2</sup>, R.Y. Surampalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

***Bioressource Technology. Submitted***



## **Bioconversion des eaux usées industrielles et des boues d'épuration en biopesticide à base de Bt, dans un fermenteur pilote**

### **Résumé**

Des eaux usées de l'industrie de transformation de l'amidon (SWW), et de l'industrie d'abatage (SHWW), de même que diverses boues d'épuration municipales (Jonquière, Québec et Black Lake) ont été utilisées comme susbtrat de fermentation abordable pour la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dans un fermenteur de volume de travail de 100L. Le potentiel entomotoxique de Bt dans les différentes boues secondaires (JQS:  $12 \times 10^9$  SBU/L, CUQS:  $13 \times 10^9$  SBU/L et BLS:  $16 \times 10^9$  SBU/L) et SWW ( $18 \times 10^9$  SBU/L) est plus élevé que celui obtenu dans le milieu semi synthétique à base de farine de soja ( $10 \times 10^9$  SBU/L). Les variations de performances (croissance, sporulation, activité protéolytique et potentiel entomotoxique) entre les 3 types de boues sont directement reliés à la disponibilité des protéines et carbohydrates, qui pourrait varier en fonction de l'origine des boues et leur méthode de génération. Une haute activité protéolytique est obtenue dans les boues de la CUQ (4,1 UI/ml) en raison d'une grande concentration de protéines complexes et spécifiquement de quantités élevées de matières en suspension dans les boues. Toutefois les grandes quantités de carbohydrates dans SWW entravent la production des protéases. Les plus faibles taux de croissance et d'entomotoxicité ont été obtenus dans SHWW à cause de la faible disponibilité des sources de carbone et d'azote.

**Mots clés:** Boue d'épuration, eaux usées amidonnées, eaux usées de l'industrie d'abatage, biopesticides, *Bacillus thuringiensis*, sporulation, entomotoxicité, activité protéolytique.

## **Abstract**

Starch industrial wastewater (SWW), slaughterhouse industrial wastewater (SHWW) and wastewater sludges from three different wastewater treatment plants (Jonquière-JQS, Communauté Urbaine de Québec-CUQ and Black lake-BLS) located in Quebec were used for cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* (Bt) based biopesticides in a pilot scale fermentor (100 L working volume). Among all, slaughterhouse industry wastewater showed lowest Bt growth and entomotoxicity (Tx) production because of low availability of carbon, nitrogen and other nutrients. The Tx potential of Bt obtained in different secondary sludges (JQS:  $12 \times 10^9$  SBU/L; CUQS:  $13 \times 10^9$  SBU/L and BLS:  $16 \times 10^9$  SBU/L) and SWW ( $18 \times 10^9$  SBU/L) was higher than the soybean based synthetic medium ( $10 \times 10^9$  SBU/L). Performance variation (growth, sporulation, proteolytic activity and Tx potential) within the three type of sludge was directly related to the available protein and carbohydrates, which may change with sludge origin and methods employed for its generation. The maximal protease activity was obtained in CUQ secondary sludge (4.1 IU/mL) due to its high complex protein concentration, and especially, to its larger concentration of suspended solids. Nevertheless, high carbohydrate concentration in SWW repressed enzyme production. Among all, SHWW showed the lowest cell and spore count and Tx production because of low carbon and nitrogen availability.

**Keywords:** sewage sludge, starch industry wastewater, slaughterhouse wastewater, biopesticides.

*Bacillus thuringiensis*, sporulation, entomotoxicity, proteolytic activity.

## 1. INTRODUCTION

Reduced chemical insecticide use helps to enhance environmental quality, improve human health, make food safer, and protect useful fauna and flora. Biopesticides derived from *Bacillus thuringiensis* (Bt) are the most prominent biological agent for selective control of pest insects (Valéro *et al.*, 1999). The insecticidal activity of Bt is known to depend not only on the activity of the bacterial culture itself, but also on abiotic factors, such as the medium composition. Different carbon and nitrogen sources and C/N ratio affect the δ-endotoxin concentration in the crystal, the shape and composition of the crystal and the entomotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* (Sachidanandham *et al.*, 1999; Farrera *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 1997; Faloci *et al.*, 1993; Yudina *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1992).

Bt is commercially used to control forests and agriculture insects; however, the utilisation of Bt has been restricted due to its high cost of production through fermentation. Safe and effective insects control comes actually with a hefty price tag. The raw materials used for the production of Bt based biopesticides represent a substantial part of the overall production cost. Stanbury *et al.* (1995) estimated that 35 to 59 % of the production cost was related to the fermentation medium. Therefore, for operational purposes, there is an urgent need to produce Bt utilizing economical raw materials. An important aspect of cutting costs could be the substitution of high-cost medium ingredients based on soy flour and fish meal by complex indigenously agro-industrial waste such as cassava starch, maize starch, rice straw, fish meal, wheat bran, corn steep liquor, sugarcane molasses, cheese whey, coconut waste (Abdel-Hameed, 2001; Khuzhamshukurov *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 1999; Vora and Sethna, 1999; Vega, 1999; Zouari *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 1997; Balakrishnan and Pandey 1996) and wastewater sludge (Tirado-Montiel *et al.*, 2001; Sachdeva *et al.*, 2000). These ingredients could have low cost, year round availability and they can contain the necessary nutritional elements to sustain growth, sporulation and crystal formation by Bt. This approach of bioconversion of such residues to value added products could substantially reduce the production cost of Bt based biopesticides as well as lead to sustainable utilization of these residues, which would be socially useful and environmentally benign. In the present work, studies were made to evaluate the performance of various agro-industrial wastewaters and wastewater sludges on the entomopathogenic activity of *Bt var. kurstaki* using a 100 L working volume fermentor.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***Bacillus thuringiensis* strain**

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Btk) used in this study was acquired through the Laurentian Forestry Centre (Sainte-Foy, Quebec, Canada). An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar slants plates [TSA: 3.0% Tryptic Soya Broth (Difco)+1.5% Bacto- Agar (Difco)], incubating at 30°C for 48 hr and then storing at 4°C for future use.

### **Inoculum preparation**

The inoculum was prepared in two steps according to Lachhab *et al.* (2001). Aliquots of bacteria from the slant were used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterilised TSB (Tryptic soy Broth, 3% v/v, Difco). After 8-12 h incubation at 30 °C under shaking conditions (250 rpm), a 2% (v/v) inoculum of this broth was used as seed culture to inoculate 1000 mL Erlenmeyer flask containing 300 mL of the same medium as used in the fermentor for Bt production. The flasks were subsequently incubated in a rotary shaking incubator at 30°C at an agitation speed of 250 rpm for about 10-14 h. All the medium used for inoculum preparation were adjusted to pH 7 before autoclaving. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells (in exponential phase) of the pre-culture was transferred to the fermentor.

### **Biopesticide production media**

In this work six types of medium were used, three secondary sewage sludges, two industrial wastewaters and one commercial medium based on soybean meal that served as control. Composition of the commercial medium was as follows (g/L): soybean meal, 15.0; glucose, 5.0; starch, 5.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.3; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0.02; Zn SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.02; CaCO<sub>3</sub>, 1.0. Wastewater secondary sludge was sampled from three different wastewater treatment plants located in Québec; namely, Communauté Urbaine de Québec (CUQS), Jonquière (JQS) and Black Lake (BLS). The CUQ secondary sludge was settled to increase the solids concentration to 25g/L. The composition of the sludges used is presented in Table 1. The industrial wastewater samples (Table 2) were obtained from a starch production plant (SWW) and from a slaughterhouse (SHWW).

### Pilot scale fermentation

Fermentations were conducted in a pilot scale bioreactor (150 L total capacity) with 100 L working volume equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The computer program (Fix 5.5, Intellution, Foxborough, MA, USA) used allowed for automatic set-point control and recording of all stated parameters.

Before each sterilisation cycle, the pH-electrode was calibrated using buffers of known pH, pH 7 and 4 (VWR, Mississauga, Ontario, Canada). The oxygen probe was calibrated to zero (with a 1N sodium sulphite solution) and 100% (saturated with air). Wastewater or sludge (100 L) was added to the fermentor and polypropylene glycol (PPG, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) (0.1% v/v solution) was added to control foaming during sterilisation. The fermentor was, then, sterilised in situ at 121°C for 30 min.

After sterilisation, the fermentor was cooled to 30°C. The dissolved oxygen (DO) probe was recalibrated to zero by sparging N<sub>2</sub> gas and to 100% saturation by sparging air at an agitation rate of 150 rev/min. The fermentor was subsequently inoculated (2% v/v inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. The agitation speed (100 to 150 rev/min) and aeration rate (0.3 and 0.5 vvm) were varied in order to keep the dissolved oxygen values above 30% of saturation, which ensured the oxygen concentration above the critical level (Avignone-Rossa *et al.*, 1992). The temperature was controlled at 30°C ± 1 by circulating hot or cold water through the jacket using a circulation pump. The pH was controlled at 7.0 ± 0.1 using either 4N NaOH or 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> through computer-controlled peristaltic pumps. Foaming during the fermentation was controlled using both a mechanical foam breaker and a chemical antifoam (a 1:10 aqueous emulsion of PPG). Dissolved oxygen and pH were continuously monitored by means of a polarographic dissolved oxygen probe (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) and of a pH sensor (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA), respectively. Samples were collected periodically to monitor the changes in total cell count, spore count, proteolytic activity and entomotoxicity (Tx) as described in the following section.

### **Estimation of cell and spore count**

To determine cell and spore count the samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1mL) were plated on TSA plates and incubated at 30°C for 24h to form fully developed colonies. For spore count (SC), the appropriately diluted samples were heated in a silicone bath at 80°C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. This heat/cold shock lysed the vegetative cells and liberated those spores already formed in the bacterial cells. The titter of cell and spore count were estimated by counting colonies grown on nutrition medium. For all counts, the average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30 to 300 colonies were enumerated per plate. The results were expressed as colony forming units per mL (cfu/mL). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated in three different plates and the colonies were counted and the standard deviation was calculated using Microsoft Excel's built-in STDEV function ("nonbiased" or "n<sup>-1</sup>" method). The standard deviation thus calculated was 6%.

### **Bioassay**

The entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality to eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray 76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). This product contains a mixture of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* at a potency of 20.1x10<sup>9</sup> IU/L (International Unit) measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented sludge samples using spruce budworm larvae and cabbage looper. It was found that SBU values reported in this research was 20-25% higher than IU values.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method (Beegle, 1990). With this technique, 1.5 mL of serially decimal diluted sample was mixed into 30mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1 mL in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to correct the

mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm, kindly supplied by the Laurentian Forestry centre (Ste-Foy, Quebec, Canada), was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was evaluated. Samples showing mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The same sample was tested 10 times against spruce budworm larvae and standard deviation for the entomotoxicity measurement using Microsoft Excel's built-in STDEV function was less than 5%.

### **Proteolytic activity assay**

Proteolytic activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 8000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer pH 8.2. Alkaline protease activity was assayed by incubating 1mL of properly diluted enzyme solution with 5mL of casein solution (1.2% w/v, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) during 10 minutes at 37°C in a constant temperature water batch. The reaction was terminated by adding 5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of this incubation period, the samples as well as the blanks were filtered using Whatman paper 934-AH (Whatman Inc, Clifton, NJ, USA). The absorbance of the filtrate was measured at 275 nm using a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Varian Techtron Pty. Ltd., Springvale, Victoria, Australia). Validation of the results was established by treating a standard enzyme solution of known enzymatic activity, in the same way and under the same conditions. One proteolytic activity unit was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1  $\mu$ mole (181 $\mu$ g) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. In order to check the reproducibility of the enzyme measurement, 10 samples were collected (at the same time) from a shake flask experiment. The samples were appropriately diluted and enzyme activity was determined in individual samples followed by the calculation of standard deviation. The statistical treatment of the results using Microsoft Excel's built-in STDEV function showed maximal deviations of 5%.

### **Sludge and wastewater analysis**

The physical characteristics of sewage sludge and industrial wastewater such as total sludge solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods (APHA, 1989). Chemical characteristics of sludge like total carbon and total nitrogen, were analysed with a Carlo Erba NA1500-NCS analyser (Carlo Erba Instrument, Milan, Italy). Other chemical components in sludge such as ammonia nitrogen, nitrogen as NO<sub>x</sub>, total phosphorus and phosphate as PO<sub>4</sub> were analysed using a Technicon Analyser II (Technicon Instruments Corporation, New York, NY, USA). Metals concentrations (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn, Mg, Ca and Na) were analysed using an atomic absorption spectrometer Spectra AA-20 (Varian Techtron Pty. Ltd., Springvale, Victoria, Australia).

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### ***3.1 Growth, sporulation and entomotoxicity potency in different cultivation medium***

Evolution of the total cell and spore count during fermentation course was illustrated in Figure 1. Regardless of cultivation medium, growth and sporulation of Bt var kurstaki were characterized by sigmoidal shape of the curves. Except slaughterhouse wastewater, in all medium there was a short lag phase, and could be attributed to good adaptation of Bt in the pre-culture stage. This stage allowed the bacteria to synthesize specific enzymes for the degradation of the organic matter present in different wastewaters and sludge, and allowed them to devote their energy to the cellular development (Lachhab *et al.*, 2001). The low total nitrogen value (133mg/l) in the case of slaughterhouse wastewater may explain this delay of growth. This was in agreement with previous findings to the effect that a lag period could be achieved by additional nitrogen source (Içgen *et al.*, 2002b).

As shown in Figure 1, length of the vegetative growth depended on the type of medium used for cultivation. A longer vegetative growth was observed in starch industry wastewater medium. This could be attributed to higher carbohydrate content, which might have prolonged the exponential growth phase, delaying sporulation and lysis (Zouari *et al.*, 1998).

Maximal cell count was reported in starch industry wastewater ( $1.69 \times 10^9$  cfu/mL). This high cell count could be attributed to the presence of higher carbon source (soluble starch). *Bacillus thuringiensis* is an amylolytic bacterium characterized by a strong production of amylases (Zouari and Jaoua, 1999b). In spite of high cell count in starch industry wastewater medium, comparatively a lower sporulation (40%) was observed (Table 3) and could be due to the production and accumulation of nitrogen metabolites. These metabolites regulate, through a feed back mechanism, the production of spores and crystal during fermentation of Bt (Alves *et al.*, 1997). Yang and Wang (1998) showed that a high concentration in sources of nitrogen and carbon reduced the percentage of sporulation. Therefore, low sporulation in starch industry wastewater could be due to comparative high availability of carbon and nitrogen sources. In comparison, BLS sludge medium containing lower carbon and nitrogen concentration achieved the highest sporulation (95%) and the highest spore concentration (Table 3). This count was twice the concentration achieved in soybean based synthetic medium.

The comparative data on the entomotoxicity potential obtained in the different medium after 48h growth are shown in Table 3. It was important to note that the Tx values of Bt in secondary sludge and SWW were higher than the soybean based synthetic medium. The highest Tx was obtained in SWW ( $18 \times 10^9$  SBU/L) and BLS ( $16 \times 10^9$  SBU/L), the lowest in SHWW ( $6 \times 10^9$  SBU/L). A lower value of maximal specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) in SHWW suggested that nutrients availability may have limited vegetative growth and, then, sporulation and finally Tx value.

### **3.2 Effect of sludge origin on Bt process performance**

The various sludges used in this study represented differences in geographical location and community size as well as wastewater treatment technology employed in wastewater treatment plants (biofiltration for CUQS, activated sludge for JQS and sequencing batch reactor BLS). Variation in the entomotoxicity on the three types of sludge could be directly related to different chemical and physical characteristics of the secondary wastewater sludge. Nutrient availability and sludge complexity change with sludge origin, season-to-season, batch to batch and on the methods used for its generation (Vidyarthi *et al.*, 2002; Tirado-Montiel *et al.*, 2001; Krogmann *et al.*, 1997).

The entomotoxicity potentials were better at 25g/L (CUQS and BLS) then at 20g/L sludge suspended solids (JQS). Suspended solids concentration in wastewater sludge provides higher availability of nutrients for the production of delta-endotoxins with an optimal value around 25 g/L (Lachhab *et al.*, 2001; Sachdeva *et al.*, 2000).

Also, the C/N ratio played an important role on the final entomocidal activity in the medium (Vidyarthi *et al.*, 2002). The recorded entomotoxicity potency with the three sludges studied in this work was observed at C/N ratio 5.9 in BLS sludge (Table 3). However, Vidyarthi *et al.* (2002) obtained the best entomotoxicity for C/N ratio of 7.9-9.9. These authors adjusted different C/N ratio by mixing primary and secondary sludge from the same wastewater treatment plant. These differences could be ascribed to the inconsistency of this complex medium, which could be caused by to difference in the availability of the nitrogen and carbon sources in sludge produced at different time in different wastewater treatment plants. Also, the present experiments were conducted in fermentor at controlled conditions of pH and dissolved oxygen whereas Vidyarthi *et al.* (2002) performed their experiments in shake without exerting control on these parameters. This could have also contributed towards a shift in optimal C/N ratio for a maximal Tx value.

The BLS showed higher cell and spore counts and especially, higher endotoxin production compared to the two other sludges. This may have been due to the fact that BLS sludge is relatively rich in carbon and nitrogen sources (Table 1). Moreover, higher levels of soluble salts such as  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  were also observed in this medium (Table 1). Içgen *et al.* (2002a) and Braun (2000) showed that deficiency in one of these two elements reduced growth and sporulation, but the most remarkable effect was a decrease in toxin synthesis. Magnesium acts also as an enzymatic regulator, by the activation of some enzymes involved in spore formation (Içgen *et al.*, 2002a). Manganese seems to be the most critical element, as substantial increase has been demonstrated in the yield of the toxins Cry4Ba and Cry11Aa with increase in the Mn concentration (Içgen *et al.*, 2002a). This element must exist in sufficient concentration in order not to affect negatively the production of endotoxins (Ozkan *et al.*, 2003).

It is also interesting to note a substantial improvement in entomocidal potential with the three types of sludge used compared to the results of Vidyarthi *et al.* (2002). An enhancement of Tx value by 20, 30 and 40% for JQS, CUQS and BLS, respectively, was recorded. These significant improvements could be explained by the control of oxygen concentration and of pH in the fermentor compared with the shake flasks used by Vidyarthi and co-workers. The increase in working volume did not seem to affect the performance of the process as it have been demonstrated by Yezza *et al.*, 2004a). This latter concluded that Bt fermentation process using sludge as raw material was successfully scaled up and resulted in high productivity for toxin protein yield and a high protease activity.

### ***3.3 Effect of medium composition on protease activity***

*Bacillus thuringiensis* synthesizes different types of proteases from the beginning of sporulation, required to hydrolyse complex proteins in order to satisfy its nutritional needs (Chu *et al.*, 1992). The production of these proteolytic enzymes depends on the availability of the nitrogen and carbon sources (Zouari *et al.*, 2002; Zouari and Jaoua, 1999ab). The evolution of proteolytic activity produced in different cultivation medium was illustrated in Figure 2. Regardless cultivation medium, protease activity increased with fermentation time, attained a maximum after that an abrupt decrease was recorded. This decrease could be due to inactivation of enzyme by prolonged agitation at 30°C, auto-digestion and limitation of carbon and nitrogen sources in the cultivation medium (Chu *et al.*, 1992). The magnitude and time of protease peak depends on medium composition (suspended solids concentration of sludge, complexity and availability of carbon and nitrogen sources).

The maximal protease activity observed with the sludge was generally higher than that recorded with the wastewaters and the synthetic medium, which corroborated the results of Tyagi *et al.* (2002). These workers found that the activity in sludge was two times higher than that recorded in soybean medium. It seems that, high carbohydrate concentrations repressed enzyme production in synthetic as well as in starch industrial wastewater medium (Zouari *et al.*, 2002).

Higher protease activity was recorded with CUQ secondary sludge, with a maximum of 4.1 IU/mL obtained after 30h of fermentation. This high enzyme activity in CUQS medium could be explained by the presence of higher concentration of complex nutrients or complex proteins, and, especially, by a larger quantity of suspended solids. In fact, the quantity of proteolytic activities obtained depends on the complexity of proteins and on the availability of carbon sources in the medium (Tan and Donovan, 2000; Zouari and Jaoua, 1999ab). Presence of a low concentration of complex proteins in wastewaters and synthetic medium could be the reason for low enzyme activity.

### **3.4 Spore count and entomotoxicity potency**

It is widely recognized that the  $\delta$ -endotoxin production is associated with the *Bacillus thuringiensis* sporulation process (Zouari *et al.*, 1998; Baum and Malvar, 1995). However, disparities remains concerning the influence of spore concentration on final entomotoxicity potency.

From Table 3, irrespective of cultivation medium, the highest entomotoxicity potency was observed at maximum spore count. In sludge medium increased Tx value was observed with increased spore concentration. Thus, an increase of Tx value with increase in spore count was evident from this work as has been done in past by many researchers using wastewater sludge and synthetic medium (Yezza *et al.*, 2004ab; Tirado-Montiel *et al.*, 2003; Vidyarthi *et al.*, 2002; Aronson 2002, Lisansky *et al.*, 1993). The presence of spores exerts a synergistic effect on the activity of the toxin crystals and final entomocidal potency. It is probable that the capacity of germination, and thus the invasion by the spores, is mainly responsible for the synergistic effect with respect to  $\delta$ -endotoxins (Salamitou *et al.*, 1996).

However, at comparable or higher spore count, Tx value in sludge was higher than those obtained in semi-synthetic medium based soybean. This indicated that the toxin crystals produced by Bt while growing in wastewater sludge were more toxic than that produced in the synthetic medium as has been suggested by Yezza *et al.* (2004b) and Barnabé (2004). However, it is difficult to predict the change in the magnitude of Tx value based on spore concentration and is highly

dependent on the characteristics of the raw material used and the process strategy applied. Thus, the decision regarding entomotoxicity value based on merely spore count, as has been proposed by many researchers, could be highly misleading. Extensive sporulation (a high spore count or a high sporulation rate) could handicap the synthesis of toxins. It was shown that a high concentration of spores was not sufficient in order to ensure a good Tx value (Perani and Bishop, 2000; Zouari *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 1997). The work of Ozkan *et al.* (2003) and of Içegen *et al.* (2002b) also confirmed this hypothesis. Good sporulation could be interpreted as suitable timing for the beginning of this phenomenon and a reasonable spore count carried out during the fermentation process (Liu and Tzeng, 2000). In other words, a strong density of spores will inhibit the formation of endotoxins and thus it will not guarantee a better entomocidal potential.

#### **4. Conclusion**

Different industrial wastewaters and municipal wastewater sludges were used as raw materials for production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* based biopesticides in pilot plant fermentor. Sludge and starch industrial wastewater proved to be very effective media for cultivation of Bt. The variation of entomotoxicity potency based on three secondary sludges was directly related to the available nutrients, which could change with sludge origin and methods employed for its generation. The secondary wastewater sludge showed to be suitable medium for simultaneous production of Bt toxins and alkaline proteases, without affecting the entomotoxicity of the final broth. Slaughterhouse wastewater resulted in very low growth and entomotoxicity potential.

#### **Acknowledgements**

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STR 202047 and SCF 192190-96). The views and opinions expressed in this article are those of authors and should not be construed as opinions of the US Environmental Protection Agency.

## References

- Abdel-Hameed A., 2001. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17, 857-861.
- Adams T.T., Eiteman M.A., Adang M.J., 1999. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex medium. *Bioresource Technology* 67, 83-87.
- Alves L.F.A., Alves S.B., Pereira R.M., Capalbo D.M.F., 1997. Production of *Bacillus thuringiensis Berliner* var. *kurstaki* grown in alternative medium. *Biocontrol Science and Technology* 7, 377-383.
- APHA, AWWA, WPCF 1989. Standard Methods for Examination of Waters and Wastewaters, 17th ed. *American Public Health Association*, Washington DC, USA.
- Aronson A., 2002. Sporulation and δ-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 417-425.
- Avignone-Rossa C., Arcas J., Mignone C., 1992. *Bacillus thuringiensis*, sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 301-304.
- Balakrishnan K., Pandey A., 1996. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 55, 365–372.
- Barnabé S., 2004. Bioconversion des boues d'épuration en biopesticides : utiliser le plein potentiel nutritif du substrat pour une meilleure valeur ajoutée (entomotoxicité). Ph.D. thesis, INRS-ETE, Quebec University, Quebec, Canada.
- Baum J., Malvar T., 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* 18, 1-12.
- Beegle C.C., 1990. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. In: Hickle L. A., Fitch W. L. (Eds.), *Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis**. American Chemical Society, USA, pp. 14-21.
- Braun S., 2000. Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses. In: Navon A., Ascher K.R.S (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB International 2000, pp. 49-72.

- Chu I.M., Lee C., Li T.S., 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch culture of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. Enzyme Microbiology and Technology 14, 755-761.
- Faloci M.M., Yantorno O.M., Marino H.A., Arcas J.A., Ertola R.J., 1993. Effect of the medium composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ-endotoxin. World Journal of Microbiology and Biotechnology 6, 32-38.
- Farrera F., Perez-guevara F., De La Torre M., 1998. Carbon: Nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. Applied Microbiology and Biotechnology 49, 758-765.
- Içgen Y., Içgen B., Ozcengiz, 2002a. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of mineral elements and pH. Research in Microbiology 153 (9), 599-604.
- Içgen Y., Içgen B., Ozcengiz G., 2002b. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of Carbon and nitrogen sources. Research in Microbiology 153 (9), 605-609.
- Kang B.C., Lee S.Y., Chang H.N., 1992. Enhanced spore production of *bacillus thuringiensis* by Fed Batch Culture. Biotechnology letters 14 (8), 721-726.
- Khuzhamshukurov N.A., Yusupov T.Y., Khalilov I.M., Guzalova A.G., Muradov M.M., Davranov K.D., 2001. The insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* cells. Applied Biochemistry and Microbiology 37 (6), 596-598.
- Krogmann U., Boyles L.S., Martel C.J., McComas K.A., 1997. Biosolids and sludge management. Water and Environment Research 69, 534-550.
- Kunitz M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol 30, 291-310.
- Lachhab K., Tyagi R.D., Valero J.R., 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochemistry 37 (2), 197-208.
- Liu C.M., Tzeng Y.M., 2000. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology and Bioengineering 68 (1), 11-17.
- Lisansky S.G., Quinlan R.J., Tassoni G., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook. CPL Press, Newbury, pp. 124.
- Ozkan M., Dilek F.B., Yetis U., Ozcenig G., 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. Research in Microbiology 154, 49-53.

- Perani M., Bishop A., 2000. Effects of medium composition on δ-endotoxin production and morphology of *Bacillus thuringiensis* in wild types and spontaneously mutated strains. *Microbios* 101, 47-66.
- Sachdeva V., Tyagi R.D., Valero J.R., 2000. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology* 42, 211-216.
- Salamitou S., Marchal M., Lereclus D., 1996. *Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif. *Annales de l'institut pasteur/actualité* 7 (4), 285-296.
- Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S.J., 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Second edition. New York: Elsevier Science Ltd.
- Tan Y., Donovan W.P., 2000. Deletion of aprA and nprA genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of Biotechnology* 84, 67-72.
- Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y., 2003. Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material – Effect of process parameters. *Water Science and Technology* 48 (8), 239-246.
- Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valero J.R., 2001. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research* 35 (16), 3807-3816.
- Tyagi R.D., Foko V.S., Barnabé S., Vidyarthi A.S., Valero J.R., 2002. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material. *Water Science and Technology* 46, (10), 247-254.
- Valero J.R., Mohammedi S., Payne N.J., Tyagi R.D., 1999. Microbial control of defoliating forest insects. *Recent Res. Devel. Microbiology* 3, 455-464.
- Vega O.F.L., 1999. A review of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production and use in Cuba. *Biocontrol News and Information* 20 (1), 47-48.
- Vidyarthi A.S., Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y., 2002. Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 36, 4850-4860.
- Vora D., Sethna Y.I., 1999. Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki in oil seed extract media containing cystine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 747-749.

- Yang X.M., Wang S.S., 1998. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 28, 95-98.
- Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., and Surampalli R.Y., 2004a. Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, In press.
- Yezza A., Tyagi R.D., Valéro J.R., and Surampalli R.Y., 2004b. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. In press.
- Yudina T.G., Salamakha O.V., Olekhnovich E.V., Rogatykh N.P., Egorov N.S., 1993. Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* 61, 402-407.
- Zouari N., Achour O., Jaoua S., 2002. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal medium in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermentors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77, 877-882.
- Zouari N., Jaoua S., 1999a. The effect of complex carbon and nitrogen, salt, tween 80 and acetate on delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 497-502.
- Zouari N., Jaoua S., 1999b. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ-endotoxin by *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* strain grown on gruel-based medium. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 364–371.
- Zouari N., Dhouib A., Ellouz R., Jaoua S., 1998. Nutritional requiremens of strain of *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* and use of gruel hydrolysate, for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. *Appl. Biochem. Biotechnology* 69, 1-52.

**Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge from CUQ (CUQS), Jonquiere (JQS) and Black Lake (BLS)**

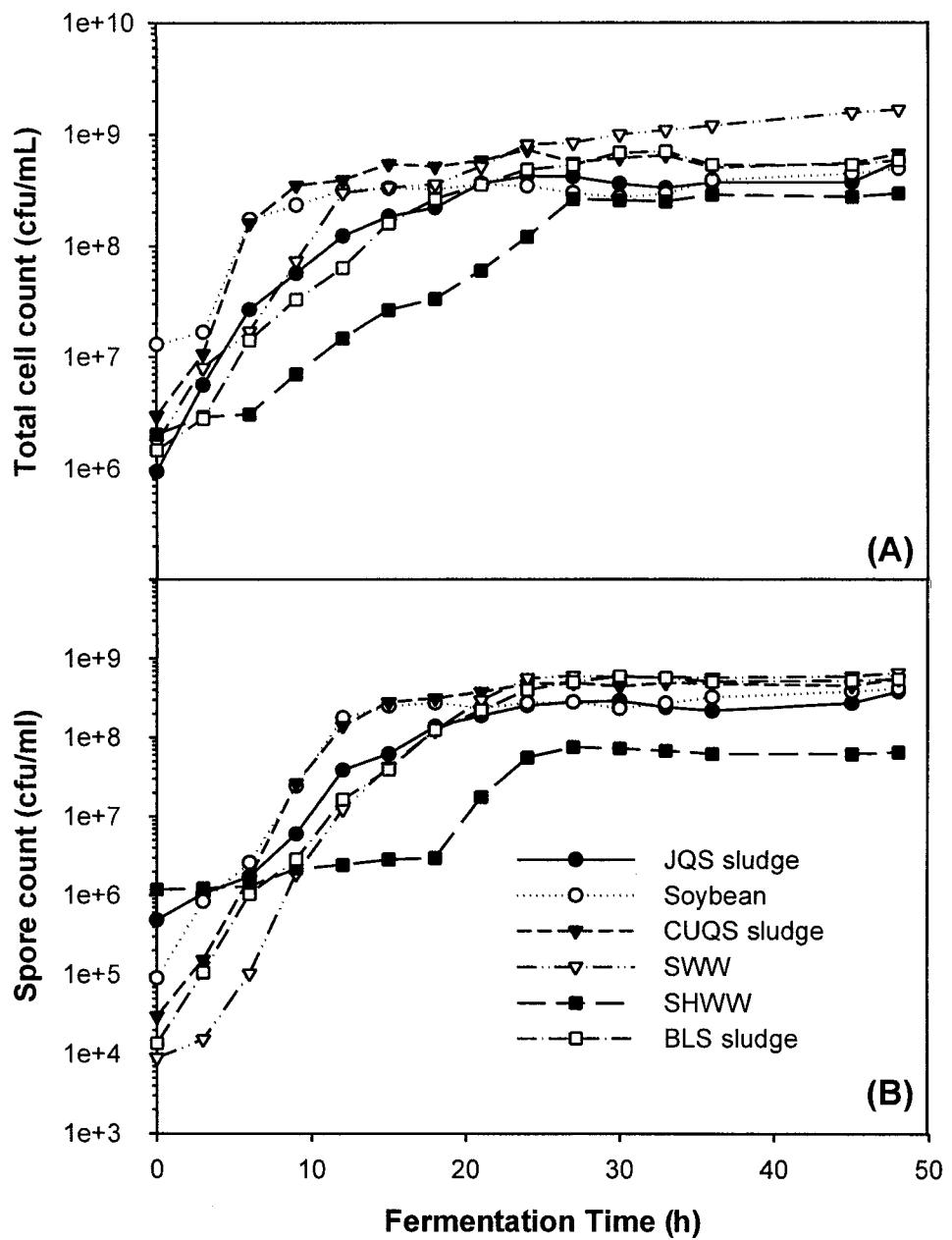
Characteristics	CUQS	JQS	BLS
<i>Physical Characteristics</i>			
Total Solids (TS) (g l <sup>-1</sup> )	29	21	30
Volatile Solids (VS) (g l <sup>-1</sup> )	19	12	20
Suspended solids (SS) (g l <sup>-1</sup> )	25	20	25
Volatile suspended solids (VSS) (g l <sup>-1</sup> )	18	11	17
pH	5.7	6.8	6.6
<i>Chemical Characteristics</i>			
Total carbon (%, dry TS)	40.4	32.9	44.3
Total nitrogen (%, dry TS)	5.25	4.84	7.59
Ammonical nitrogen (mgN/kg)	632	572	982
Total Phosphorus (mgP/kg)	10 525	7 981	15 075
Total Inorganic Phosphorus (mgP/kg)	5830	4648	2835
<i>Metals (in mg/kg)</i>			
Al <sup>3+</sup>	16 445	11 253	6200
Ca <sup>2+</sup>	18 778	19 531	9500
Cd <sup>2+</sup>	3.3	0.7	1.5
Cr <sup>2+</sup>	94	121	110
Cu <sup>+</sup>	271	132	1500
Fe <sup>2+</sup>	12 727	5892	37 000
Mg <sup>2+</sup>	2 556	1753	12 000
Mn <sup>2+</sup>	182	132	320
K <sup>+</sup>	2563	2469	2800
Pb <sup>2+</sup>	67	38	110
Zn <sup>2+</sup>	551	439	430

**Table 2. Characteristics of industrial wastewater**

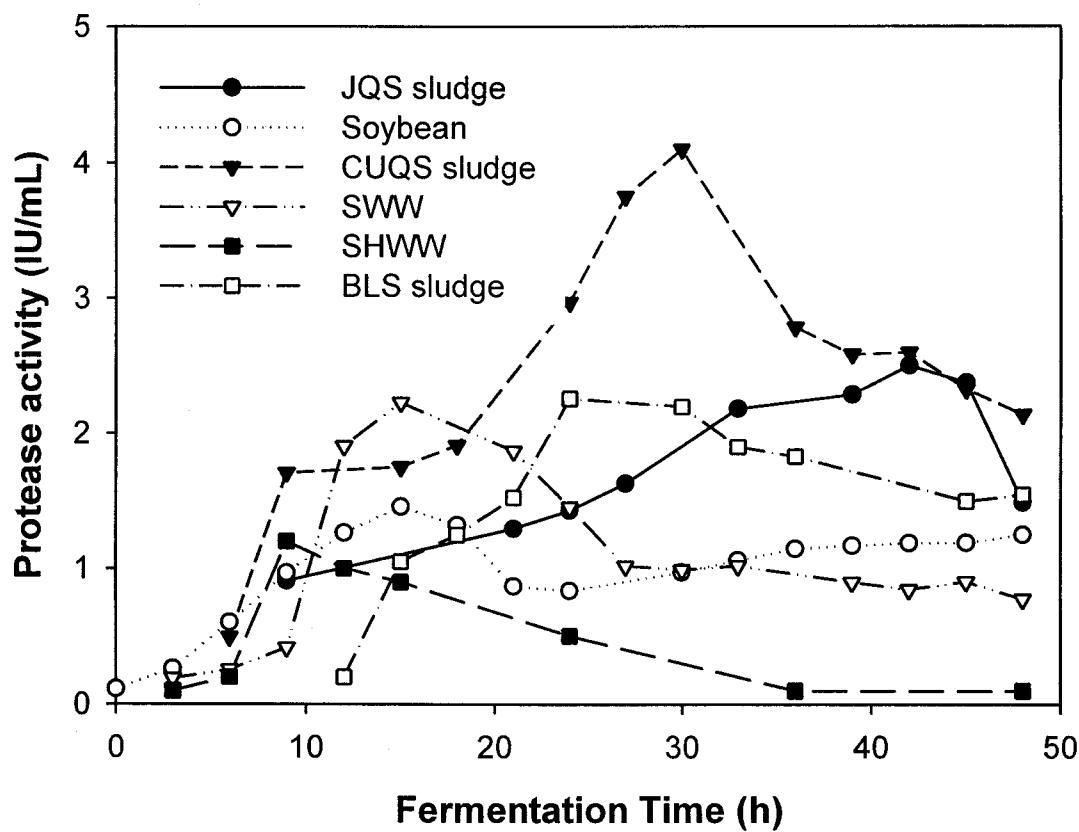
Characteristics	Wastewater	
	Starch	Slaughterhouse
Total Solids (TS) (g l <sup>-1</sup> )	17	11
Suspended solids (SS) (g l <sup>-1</sup> )	11	5
Volatile suspended solids (VSS) (g l <sup>-1</sup> )	8	4
pH	3.81	6.90
Total carbon (%, dry TS)	51.83	13.46
Total nitrogen (%, dry TS)	8.89	1.33
Total Phosphorous (mgP/kg)	14 334	2010

**Table3.** Growth parameters, protease activity and entomotoxicity observed in different medium in 150L fermentor

Culture Medium	SS (g/l)	C/N Ratio	Max cell count At 48h (cfu/mL)	Max spore count at 48h (cfu/mL)	Sporulation at 48h (%)	$\mu_{\text{max}}$ (h <sup>-1</sup> )	Max protease activity (IU/mL)	Max TX at 48h (10 <sup>9</sup> SBU/L)
Soybean medium	***	***	4.90 e <sup>+08</sup>	4.17 e <sup>+08</sup>	85	0.439	1.5 at (15h)	10
CUQ Secondary Sludge	25	7.7	6.67 e <sup>+08</sup>	5.53 e <sup>+08</sup>	83	0.567	4.1 at (30h)	13
Jonquiere Secondary Sludge	20	6.8	5.70 e <sup>+08</sup>	3.8 e <sup>+08</sup>	67	0.462	2.5 at (42h)	12
Black Lake Secondary Sludge	25	5.9	7.03 e <sup>+08</sup>	6.67 e <sup>+08</sup>	95	0.425	2.3 at (24h)	16
Starch industry wastewater	11	5.8	1.69 e <sup>+09</sup>	6.6 e <sup>+08</sup>	40	0.418	2.2 at (15h)	18
Slaughterhouse wastewater	5	10.1	2.93 e <sup>+08</sup>	6.47 e <sup>+07</sup>	22	0.197	1.2 at (9h)	6



**Figure 1. Growth (A) and variation of spore count (B) of *Bt* var. *kurstaki* in six media during 48 h fermentation time**



**Figure 2. Evolution of protease activity during the fermentation course in different cultivation medium**

## **CHAPITRE 3 : STRATÉGIES DÉVELOPPÉES POUR L'AMÉLIORATION DU POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE**



## **Partie I**

### **Production of *Bacillus thuringiensis* based Biopesticides in Batch and Fed Batch Cultures Using Wastewater Sludge as Raw Material**

**A.Yezza<sup>1</sup>, R.D. Tyagi<sup>1</sup>, J.R. Valéro<sup>1,2</sup>, R.Y. Surampalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

*Journal of Chemical Technology and Biotechnology. In Press*



## **Production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* en mode de culture batch et fed batch, en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation**

### **Résumé**

*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a été cultivé dans des boues d'épuration en mode de culture batch et expansé (fed batch). Une simple stratégie d'alimentation se basant sur la mesure de l'oxygène dissout, a été développée dans ce projet. Il a été établi qu'en passant du mode de culture batch au mode fed batch, la concentration maximale de spores augmenta de  $5,62 \times 10^8$  à  $8,6 \times 10^8$  ufc/mL, résultant en une amélioration du potentiel entomotoxique de  $13 \times 10^9$  à  $18 \times 10^9$  SBU/L. Une entomotoxicité élevée a été obtenue dans les boues même avec un faible compte de spore, contrairement au milieu synthétique avec lequel nous enregistrons de comptes de spores élevés contre un potentiel entomotoxique moindre.

**Mots clés:** *Bacillus thuringiensis*, Boues d'épuration, Culture en mode Fed batch, Entomotoxicité, activité protéolytique, Sporulation.

## **Abstract**

*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* was grown in batch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material. A simple fed batch strategy based on DO measurement during the fermentation cycle was developed in this work. It was established that while shifting the process strategy from batch to fed batch, the maximum spore concentration was increased from  $5.62 \times 10^8$  to  $8.6 \times 10^8$  cfu/mL and resulted in an increase of entomocidal activity from  $13 \times 10^9$  to  $18 \times 10^9$  SBU/L. Higher entomotoxicity was recorded at low spore concentration using wastewater sludge as a raw material whereas low entomotoxicity was reported at high spore concentration in synthetic medium.

**Keywords :** *Bacillus thuringiensis*, Wastewater sludge, Fed batch culture, Entomotoxicity, Protease activity, Sporulation.

## 1. INTRODUCTION

High protein (toxin) productivity or entomocidal activity is the goal for the process optimization of *Bacillus thuringiensis* (Bt) fermentation using synthetic medium or natural complex medium (such as wastewater sludge) as raw materials. In a batch culture, the optimization of different fermentation parameters namely temperature, pH, agitation and aeration, volume and age of inoculum, sludge suspended solids concentration, C/N ratio and various pre-treatments methods of sludge undeniably allowed to achieve higher entomotoxicity (Tx) in the final product.<sup>1-6</sup> In fact, all our previous studies on Bt fermentation using sludge as a raw material has been done in conventional batch process. The principal disadvantages of batch process are the high proportion of unproductive time (down-time) between batches, comprising the charge and discharge of the fermentor vessel, the cleaning, calibration, sterilization, and process re-starts. However, the cell and spore concentration and hence the Tx value can be further increased by adopting various operational process strategies.

Fed batch fermentation provides a valuable tool in order to increase productivity and a concomitant decrease in product manufacturing cost.<sup>7-10</sup> The outcome of fed batch culture depends on many variables such as fermentation time, feed rate profile, availability of nutrients in the medium, oxygen concentration and pH profile.<sup>11</sup> The main issue of such systems is to maintain an appropriate feeding strategy to prevent overfeeding or underfeeding.<sup>12-15</sup>

The fed batch operational strategy has been successfully studied to augment Bt cells and spores counts and the process productivity using conventional synthetic medium. Kuppusamy and Balaraman<sup>14</sup> established that high cell density of Bt H-14 could be achieved without any negative effect on sporulation and endotoxin expression by adopting a simple fed batch control based only on glucose limitation. The concentration of Bt cells could be improved from 6g dry weight (DW)/L in a batch system to well over 50g DW/L in a well designed fed batch operation in laboratory fermentor using synthetic medium.<sup>16</sup> Kang *et al*<sup>17</sup> obtained a spore concentration of  $1.25 \times 10^{10}$  spores/mL by employing intermittent fed batch culture in modified GYS medium. Using a fed batch strategy based on motile intensity, Chen *et al*<sup>18</sup> showed that the maximum cell concentration increased up to 50% compared to the batch culture. However, all these studies were carried using synthetic medium and toxin yield or Tx value was not reported. Therefore, the aim

of this work was to develop a fed batch strategy to find out how much cell and spore counts and the Tx value could be enhanced using wastewater sludge as a sole raw material.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Bacillus thuringiensis* strain

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Bt) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar slants plates, incubating at 30°C for 48h and then storing at 4°C for future use.

### 2.2. Inoculum preparation

The inoculum was prepared in two-step process as reported by Lachhab *et al*<sup>3</sup>. All the media used for inoculum preparation were adjusted to pH 7 before autoclaving. Aliquots of bacteria from the slant were used to inoculate 500mL Erlenmeyer flask containing 100mL of sterilized TSB (tryptic soy broth, 3% (w/v), Difco). After 8-12h incubation in a rotary shaker at 30 °C and 250 rpm (revolution per minute), a 2% (v/v) of this broth was used as seed culture to inoculate 500mL Erlenmeyer flask containing 100mL of the same medium as used in the fermentor for Bt production. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 30°C and 250 rpm for about 8-12h. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

### 2.3. Fermentation medium

Batch and fed batch cultures were carried out using secondary wastewater sludge from a wastewater treatment plant in Quebec, Canada (Communauté Urbaine du Québec). The chemical and physical characteristics of the wastewater sludge used were presented in Table 1. The sludge was settled by gravity settling to increase the suspended solids concentration to 25g/L. The physical characteristics of wastewater sludge in terms of total sludge solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to the standard methods (APHA, 1989). The total carbon and total nitrogen in wastewater sludge were analysed with NA 1500-NCS analyser (Carlo Erba Instrument). Other chemical components in the sludge like ammonia nitrogen, total phosphorus and orthophosphate as PO<sub>4</sub> were determined by Technicon Analyser II (Technicon Instruments Corporation, New York). Different

metal (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Mg, and Ca) concentrations were analysed by atomic absorption spectrometer Spectra AA-20 (Varian Techtron Pty. Ltd., Australia).

#### **2.4. Fermentation procedure**

Fermentation experiments were conducted in two-bench scale bioreactors (15L total capacity) equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The computer program (Fix 3.5, Intellution, USA) used allowed automatic set-point control and registration of all stated parameters. The two bioreactors were operated in parallel, one in batch mode and the other in fed batch mode.

Wastewater sludge was filled in the fermentor (10L for batch mode and 8L for fed batch mode) and polypropylene glycol (PPG, Sigma-Canada) (0.1% v/v) solution was added to control the foam during sterilization. The fermentors were sterilised *in situ* at 121°C for 30min. After sterilisation, fermentors were cooled to 30°C. The fermentors were then inoculated (2% v/v inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. The agitation speed (300-500 rpm) and aeration rate (0.3-0.5 vvm-Liter of air/Liter of fermentor content/minute) were varied in order to keep the dissolved oxygen (DO) values above 30% of saturation, which ensured the oxygen concentration above the critical level.<sup>20</sup> The pH was controlled at 7.0± 0.1 using either 4N NaOH or 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> through computer-controlled peristaltic pumps.

#### **2.5. Fed batch operation**

A proper feed rate of substrate is required during fed batch culture to achieve maximum productivity. In order to establish a fed batch strategy, many parameters (feeding time, feed volume, feed number, feed composition) should be optimized. Thus, preliminary work was performed in shake flask in order to identify the proper feeding strategy. This showed that, when fermentation started at 2/3 working volume, it offered a cell count two times higher than that obtained from total working volume.

In this work, two feeds were added and the feeding time was based on DO measurement during the fermentation cycle. Fermentation was started in batch mode with a working volume of 8L. Following inoculation, dissolved oxygen (DO) concentration began to drop until the end of exponential growth. After that, DO started increasing. When DO approached towards

stabilization, a fresh pre-sterilized sludge (2L) with similar suspended solids concentration (25g/L) was added. The DO decreased followed by an increase. Once the DO reached near maximum, 3L of fermentor content was withdrawn and replaced by the same amount of sterilized fresh sludge. Afterwards, the fermentation process was continued in batch mode until 72 h. The samples were drawn from the fermentors at regular intervals to determine cell, spore count, protease activity and entomotoxicity (Tx).

## 2.6. Estimation of cell and spore count

To determine cell and spore count the samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% w/v NaCl). The appropriately diluted samples (0.1mL) were plated on TSA plates and incubated at 30°C for 24h to form fully developed colonies. For spore count (SC), the appropriately diluted samples were heated in a silicone bath at 80°C for 10 min and then chilled on ice for 5 min. This heat/cold shock lysed the vegetative cells and liberated those spores already formed in the bacterial cells. The titer of cell and spore count were estimated by counting colonies grown on nutrition media. For all counts, average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30–300 colonies were counted per plate. The results were expressed in colony forming units per mL (cfu/mL). The statistical treatment of the results showed maximum deviations of 6%.

## 2.7. Bioassay

The entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality to eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray 76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). This product contains a mixture of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* at a potency of  $20.1 \times 10^9$  IU/L (International Unit) measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented sludge samples using spruce budworm larvae and cabbage looper. It was found that (SBU) reported in this research was 20-25% higher than (IU).

The bioassays were carried out using the diet incorporation method.<sup>21</sup> In this technique 1.5mL of serially decimal diluted sample was mixed into 30mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to correct the mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The standard deviation for entomotoxicity measurement was less than 5%.

## **2.8. Proteolytic activity assay**

Proteolytic activity was determined according to Kunitz<sup>22</sup> with minor modifications. Samples collected from fermentors were centrifuged at 8000 rpm for 20min at 4°C. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer pH 8.2. Alkaline protease activity was assayed by incubating 1mL of properly diluted enzyme solution with 5mL of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada inc.) during 10 minutes at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min in order to precipitate the total non-hydrolysed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of incubation period, samples as well as blanks were filtered using Whatman paper 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275 rpm. The validation of the results was established by treating a standard enzyme solution where activity was known, in the same way and under same conditions. One international proteolytic activity unit (IU) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 µmole (181µg) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. The statistical treatment of the results showed maximum deviations of 5%.

## **2.9. Determination of K<sub>La</sub>, OUR and OTR**

The volumetric oxygen transfer coefficient (K<sub>La</sub>) measurement was based on dynamic method.<sup>23</sup> This technique consists in interrupting the air input. Afterwards, the aeration is re-established. The decrease and the increase in DO concentration were recorded. K<sub>La</sub> was determined from the mass balance on DO just after sampling of fermentation broth.

During batch fermentation, the mass balance of the DO concentrations could be written as follows:

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

OTR, represent the oxygen transfer rate from gas phase to liquid phase:  $OTR = K_{La}(C^* - C_L)$

OUR, represent the oxygen uptake rate:  $OUR = Q_{O2} X$

$K_{La}$ : Volumetric oxygen transfer coefficient

$C^*$ : Saturated oxygen concentration

$C_L$ : Dissolved oxygen concentration in the medium

$Q_{O2}$ : specific oxygen uptake rate

X: cell concentration

Oxygen concentration in the fermentation broth was converted from % air saturation to mmol O<sub>2</sub>/L as follows: the DO electrode was calibrated in medium at 30°C and then transferred to air-saturated distilled water at known temperature and ambient pressure. This reading was used, with the known saturation concentration of oxygen in distilled water (0,07559 mmol/L) (100%), to estimate the saturation concentration of oxygen in the cultivation media at 30°C.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Effect of fed batch culture on process performance

Evolution of fermentation parameters,  $K_{La}$ , OTR and OUR during the proposed fed batch strategy are illustrated in Figure 1. The initial period of cultivation (approximately, first 10h) was a critical period for the overall process performance. A significant decrease in dissolved oxygen (DO) occurred after inoculation until the end of exponential growth (9h fermentation). This was due to higher oxygen uptake rate during active cell growth. Afterwards, oxygen consumption rate decreased and DO increased (9-15h growth). Similar DO drop was observed in the beginning and after the addition of fresh sludge (Figure 1).

Peaks of  $K_{La}$ , OTR and OUR, were observed when DO was minimum i.e. towards the end of exponential growth (at 9h growth) and after addition of fresh sludge (at 30h growth). It could be stated that fed batch culture required a higher oxygen transfer rate, especially when the second

feed was added. This could be attributed to higher cell density, which required high oxygen transfer rates to support growth.

Initially, two modes of fermentation (batch and fed batch culture) started with the same cell and spore count and operated under similar conditions, a higher maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) was observed when fermentor was filled with only 8L ( $0.567\text{h}^{-1}$ ) of wastewater sludge (fermentor for fed batch culture) compared to 10L working volume ( $0.436\text{h}^{-1}$ ) (fermentor for batch mode) (Table 2). It could be due to a better oxygen transfer in smaller working volume which is also evident from higher values of  $K_{La}$ , OTR and OUR for 8L working volume (Figure 1). Higher  $\mu_{\max}$  could also explain the higher cell and spore count obtained after 9 hours in fermentor for fed batch culture (Figure 2). This finding also supported the observations of Foda *et al*<sup>24</sup> who reported a marked increase in cell and spore concentrations when the ratio of total volume to operational volume was decreased in shake flask experiments.

Furthermore, foam formation at the beginning of fermentation (exponential growth) in fermentor started with 8L working volume (fed batch culture process) was low as compared to 10L working volume (batch mode) and no major foam problem was observed after or during two feeds. However, Vidyarthi *et al*<sup>25</sup> observed a higher foam production during initial batch fermentation period due to higher non-digested sludge proteins. Actively growing cells need a high oxygen uptake, which in turn require higher oxygen transfer rate furnished by higher aeration and agitation rate. This resulted in enhanced foam formation.

Batch culture of Bt using sludge as a raw material produced maximum cell count of  $6.17 \times 10^8\text{cfu/mL}$  and  $5.62 \times 10^8\text{cfu/mL}$  spore count, whereas the fed batch culture yielded  $9.07 \times 10^8\text{cfu/mL}$  of cell count and  $8.6 \times 10^8\text{cfu/mL}$  spore count (Table 2, Figure 2). Sporulation (%) - spore count/total cell count) observed at the end of fermentation (72h growth) was 95% and 91% in batch and fed batch processes, respectively (Table 2). These results confirmed that the proposed fed batch strategy could be employed to obtain high cell count and spore count on sludge medium as stated in previous reports on synthetic media.<sup>17-18,26</sup> The spore count of final broth increased proportionally with the final cell count. The high final spore count obtained in fed batch culture could be attributed to a faster cell growth during the fed batch operation as it has

been suggested by other workers.<sup>17-18,26</sup> It was likely that faster growing cells contained higher energy and other factors necessary for sporulation, while slowly growing cells did not.

### **3.2. Evolution of entomotocidal activity during fed batch culture**

Tx value increased with time (Figure 2). At 24 and 36 h fermentation, spores count was higher in batch mode, but Tx value was higher in fed batch culture than in batch mode. An increase of 20 and 25% in Tx value was observed in fed batch culture at 24 and 36h, respectively (Figure 2). This suggested that spore count was not the only indicator of entomotoxicity and was in line with the conclusions of many other workers.<sup>27-30</sup> Endotoxin and some other pathogenic factors such as vegetative insecticidal protein secreted during vegetative growth also play an important role. It is well known that Bt has complex growth characteristics. During batch growth, Bt cells change from vegetative to sporulated cells, and during this process they undergo significant metabolic, physiological and kinetic changes.<sup>31</sup> These changes seemed to become more and more complicated when fresh medium was added during fed batch culture and affected the cell growth and production of metabolites. It must be also stated here that heterogeneous population was found in the fed batch culture after addition of fresh feed: cells in dividing state, cells in sporulation process, spore maturation, crystal release, cells lysis and spore germination. In fact, when fresh sludge was added, spores could germinate (due to availability of fresh nutrients), producing more cells and consequently more spores and toxin crystals. Also fresh sludge could have provided more energy for spore maturation leading to higher Tx value.

After 48h, no substantial increase in Tx as well as the count of spores and cells was observed in fed batch culture (Figure 2). This could be due to the fact that feeding of fresh sludge was stopped. This warrents further extensive studies to optimise the feeding strategy (optimization of feed numbers, cultivation time and concentration of suspended solids in the feed) and thus developing a suitable and viable Bt process using sludge as raw material.

### **3.3. Enhancement of Entomotoxicity in fed batch process**

After 72h fermentation, the improvement of both final cell and spore count in fed batch over batch process was 1.5 times and consequently an increase of the final Tx value was 38% (Table 2). It was assumed here that a large number of cells produced a correspondingly large number of

spores, and consequently a large amount of insecticidal crystal proteins or Tx value. This also corroborated with the results of other workers.<sup>32,33</sup> These workers found that δ-endotoxin production was related to spore formation in the fed batch process.

Apart from synergistic spore effect, the higher Tx value at the end of the process in the fed batch culture compared to batch culture could be due to other factors that might have contributed to a better plasmid expression. These factors include the following. i) Larger parasporal crystal inclusion and then a production of a larger amount of δ-endotoxin. The study of Feng *et al*<sup>34</sup> showed that cells and endotoxin crystals produced in the fed batch mode appeared larger than those from batch mode. ii) Secretion of large amount of chitinases. This enzyme is produced by Bt itself and is likely to assist pathogenesis of insects by hydrolysing the chitin present in the mid gut wall.<sup>35</sup> iii) In fed batch culture, the cells were thin and motile.<sup>36</sup> Motile intensity acts as an indicator of cellular activity during the course of fermentation; higher motile intensity indicates higher nutrient consumption by Bt cells.<sup>18</sup> iv) Lesser proteolytic hydrolysis of the protein inclusion in fed batch culture due to lower protease activity compared to batch process. Protease activity gradually increased in both cultivation mode and reached a maximum of 1.5 and 2.3 IU/mL at 24 and 36h in batch and fed batch modes, respectively (Figure 2). In fact, morphological characteristics of δ-endotoxin crystal released from the cell in batch and fed batch cultures could be altered by proteases.<sup>37</sup> Moreover observations by phase contrast and electron microscopes indicated that sporulation and parasporal crystal release occurred earlier in batch than in the fed batch process.<sup>34</sup> This earlier crystal release could be detrimental to final Tx value, since higher production of protease in batch process and longer contact time (72h fermentation) could induce a loss of Tx potential.

#### **4. DISCUSSION**

Fed batch process is a well known process to increase the cell/spores concentration using synthetic medium. However, the results obtained on one raw material cannot be extrapolated to another. Therefore, one of the goals of this research was to know the gain in cell and spore count and Tx value using wastewater sludge as a raw material through slug feeding or operating the process in a fed batch mode. During the course of this work, it was established that while shifting the process strategy from batch to fed batch, the maximum spore concentration was increased

from  $5.62 \times 10^8$  to  $8.6 \times 10^8$  cfu/mL and that resulted in an increase of Tx value from  $13 \times 10^9$  to  $18 \times 10^9$  SBU/L (a gain of 38%).

It is also important to mention here that most of the work carried out on fed batch culture has been limited to measurement of Bt cells and spores concentration without measurement of Tx value and thus predicting higher Tx value based on high spore count. For example, Kang *et al*<sup>17</sup> using a glucose medium in a fed batch culture reported a spore count of  $1.25 \times 10^{10}$  cfu/mL. In order to achieve a high spore concentration, Bt growth studies were conducted on wastewater sludge with and without fortification of glucose in shake flask experiments.<sup>38</sup> The spore count was increased from  $5.63 \times 10^8$  without glucose to  $1.5 \times 10^{10}$  cfu/mL (which is of the same order as that obtained by Kang *et al*<sup>17</sup>) with glucose fortification, whereas the Tx value was increased from  $10 \times 10^9$  (without glucose) to  $12.7 \times 10^9$  SBU/L (with glucose).<sup>38</sup> Thus an increase of spore concentration by 26.6 time due to addition of glucose to sludge in batch process resulted in an increase of Tx by  $2.7 \times 10^9$  SBU/L, however, increase in spore count by 1.52 time ( $8.68 \times 10^8$  cfu/mL) while shifting from batch to fed batch culture using sludge as a raw material resulted in an increase of Tx by  $5 \times 10^9$  SBU/L.

Further, lower spore concentration ( $2.2 \times 10^8$  cfu/mL) was obtained using wastewater sludge as a sole raw material than the synthetic soybean medium ( $3.5 \times 10^9$  cfu/mL) in shake flask experiments.<sup>39</sup> However, higher Tx value was recorded in wastewater sludge ( $9 \times 10^9$  SBU/L) than synthetic medium ( $6-8 \times 10^9$  SBU/L). This indicated that the toxin crystals produced by Bt while growing in wastewater sludge were more toxic than that produced in the synthetic medium or glucose fortified sludge. Thus, an increase of Tx value with increase in spore count was evident from this work as has been done in past by many researchers. However, it is difficult to predict the change in the magnitude of Tx value based on spore concentration and is highly dependent on the characteristics of the raw material used and the process strategy applied. Thus, the decision regarding entomotoxicity value based on merely spore count, as has been proposed by many researchers, could be highly misleading.

Performance of Bt fermentation process could be directly related to the available protein and carbohydrates in the medium, which could change with sludge origin, type of wastewater treated,

method of wastewater treatment and operating conditions in a wastewater treatment plant.<sup>2,4</sup> The nutrients required for growth of Bt and synthesis of toxin crystals are embedded in sludge suspended solids (which is mostly bacterial cells). During sterilisation, the bacterial cell wall is broken and the intracellular material is released which in turn is available for Bt metabolism. The effect of variability of sludge composition on Bt growth and toxin synthesis was verified by collecting the sludge samples from CUQ wastewater treatment plant at different time (to cover seasonal, day and night and other possible variations) for a period of one year from July 1999 to July 2000. These samples were used to grow Bt under similar conditions. It was found that utilising optimum suspended solids concentration 20-25g/L, the variation of Tx value was between +9% and -13% (non-published data). Thus, sludge composition does not affect seriously the Bt process performance as long as optimum suspended solids concentration is used.

Two principal problems associated with the use of wastewater sludge as a sole raw material are the presence of toxic heavy metals and pathogens. As for pathogens, before Bt fermentation the sludge is sterilized where all types of pathogens are eliminated. As far as metals are concerned, there are abundant federal and provincial laws regulating metal concentration in sludge for agriculture, forestry and other use. Based on these laws sludge has been classified as Class A, B or C according to USEPA.<sup>40</sup> Class A sludge has been allowed with an unlimited use without any constraint. With the result, if the sludge used for Bt fermentation follows these regulations, there is no danger. The sludge used in the present experiments (Table 1) for Bt production was the one that met the regulatory criteria prescribed by Quebec Environment Ministry.<sup>41</sup> It is worth mentioning here that almost 50% of total sludge (1million tons of dry sludge solids per year) produced in Canada meets the regulatory criteria.<sup>42</sup>

Another aspect that must also be specified in relation to toxic metals is the actual quantity of sludge required that could be used for Bt growth and subsequently for application in forest or agriculture to control insects. The current application rate of the formulated Bt product to control spruce budworm in Canadian forests is about 30BIU (billions of IU) per hectare (or 1.5L of the product with potency 76B or 76BIU/gallon).<sup>43</sup> To produce 30 BIU, according to the present results ( $19 \times 10^9$  SBU/L which is equivalent to 15.2 BIU/L, 25g/L sludge suspended solids), approximately 50g of sludge will be required. In other words, application rate of sludge to control

spruce budworm is approximately 50g of Bt fermented sludge per hectare. This quantity is very low with sludge application permitted for agriculture land application (15-30 tons per hectare depending on N, P, K content) and hence metal contamination risk is almost nil.

Table 1 provides the total carbon present in the medium at suspended solids concentration of 25g/L. It is indeed very difficult to find how much carbon is available for Bt growth and toxin synthesis. However, on an average, the biodegradable solids present in secondary sludge (the type of sludge used in these experiments) varies between 30-40% (w/w).<sup>1</sup> Biodegradability of sludge also depends on the operating conditions in an individual wastewater treatment plant; the most important factor is the sludge age or mean solids retention time. Therefore, one could safely argue that 30-40% (w/w) carbon could be available for Bt metabolism. As sludge is a semisolid medium, it is also difficult to exactly measure how much carbon will be used by Bt. Moreover, at the end of fermentation, Bt cells, spores and toxin crystals are mixed with the residual solids of sludge, therefore, under present circumstances it is not possible to measure separately the non-Bt carbon.

Moreover, Tx value achieved using sludge as a raw material is much higher than those obtained in synthetic medium.<sup>39</sup> Fed batch culture using same sludge solids concentration (25g/L) further increased the value of Tx and cells and spore counts. Further, the sludge is a low cost raw material (or a negative cost material – needs disposal cost) and is available year round everywhere on the globe. The sludge also contain all required necessary nutrient elements to sustain growth, sporulation and toxin synthesis by Bt. Cost of Bt production using sludge as a raw material is much lower than that using soy based synthetic raw material.<sup>6</sup> Increase in entomotoxicity during fed batch process will further help in lowering the cost of Bt biopesticide production with wastewater sludge as a raw material. Apart from a substantial reduction of final production cost, use of wastewater sludge for the production of value added products (such as biopesticides) contributes towards a sustainable solution for sludge disposal/recycle, which is socially useful, economically viable and environmentally benign strategy.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair). The views and opinions expressed in this article are those of authors.

## **References**

1. Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D., Valero J.R. and Surampalli R.Y. (2003). Production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material: Effect of process parameters. *Water Science and technology*. **48**: 239-246.
2. Vidyarthi A.S., Tyagi R.D., Valero J.R. and Surampalli R.Y. (2002). Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*. **36**: 4850-4860.
3. Lachhab K., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*. **37**: 197-208.
4. Tirado-Montiel M.L., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research*: **35**, 3807-3816.
5. Vidyarthi A.S., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2001). Effect of surface-active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science and Technology*. **44**: 253-260.
6. Sachdeva V., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2000). Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water science and technology*. **42**: 211-216.
7. Callewaert R. and De Vuyst L. (2000). Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by Fed Batch Fermentation. *Applied and Environment Microbiology*. **66**: 606-613.
8. Giridhar R. and Srivastava A.K. (2001). Repeated Fed Batch Sorbose Fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Chemical and biochemical engineering*. **15**: 127-129.

9. Sasaki K., Jiaviriyaboonya S. and Rogers P.L. (1998). Enhancement of sporulation and crystal toxin production by cornsteep liquor feeding during intermittent fed batch culture of *Bacillus sphaericus* 2362. *Biotechnology Letters*. **20**: 165-168.
10. Longobardi G.P. (1994). Fed Batch versus Batch Fermentation. *Bioprocess Engineering*. **10**: 185-194.
11. Kuhlmann C., Bogle I.D. and Chalabi Z.S. (1998). Robust operation of fed batch fermenters. *Bioprocess Engineering*. **19**: 53-59.
12. Vallejo F., Gonzalez A., Posada A., Restrepo A. and Orduz S. (1999). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* by batch and fed batch culture. *Biotechnology Techniques* **13**: 279-281.
13. Jong J., Hsiund D. and Wu W., (1995). Fed Batch Culture of *Bacillus thuringiensis* for Thuringiensin Production in a Tower Type Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. **48**: 207-213.
14. Kuppusamy M. and Balaraman K. (1991). Fed Batch Fermentation studies with *Bacillus thuringiensis* H-14 synthesizing delta endotoxin. *Indian Journal of Experimental Biology*. **29**: 1031-1034.
15. Lee J., Lee S.Y., Park S. and Middelberg A.P. (1999). Control of Fed Batch fermentations. *Biotechnology advances*. **17**: 29-48.
16. Bihari V., Liu W.M. and Bajpai R.K. (1991). Fed batch cultivation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *J. Microb. Biotechnol.* **6**: 92-99.
17. Kang B.C., Lee S.Y. and Chang H.N. (1992). Enhanced Spore Production of *Bacillus Thuringiensis* by Fed Batch Culture. *Biotechnology Letters*. **14**: 721-726.
18. Chen S., Hong J.Y. and Wu W.T. (2003). Fed batch culture of *Bacillus thuringiensis* based on motile intensity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 677-681.
19. APHA (1989). Standard Methods for Examination of Waters and Wastewaters, 17th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
20. Avignone-Rossa C., Arcas J. and Mignone C. (1992). *Bacillus thuringiensis* sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **8**: 301-304.
21. Beegle C.C. (1990). Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. In Analytical Chemistry of

- Bacillus thuringiensis*, ed by Hickle LA and Fitch WL. American Chemical Society. pp. 14-21.
22. Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291-310.
  23. Aiba S., Humphrey A.E. and Millis N.F. (1973). Biochemical Engineering Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition. New York.
  24. Foda M.S., Salama H.F. and Selim M. (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *App. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 50-52.
  25. Vidyarthi A.S., Desrosiers M., Tyagi R.D. and Valero J.R. (2000). Foam control in biopesticides production from sewage sludge. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. **25**: 86-92.
  26. Liu W.M., Bajpai R.K. and Bihari V. (1994). High cultivation of sporeformers. *Ann. NY Acad. Sci.* **721**: 310-325.
  27. Ozkan M., Dilek F.B., Yetis U. and Ozcengiz G. (2003). Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research in Microbiology*. **154**: 49-53.
  28. Içgen Y., Içgen B. and Ozcengiz G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of Carbon and nitrogen sources. *Research in Microbiology*. **153**: 605-609.
  29. Paramatha R.B. (2002). Hyper-production of insecticidal crystal protein ( $\delta$ -endotoxin) by *Bacillus thuringiensis var israelensis* is not related to sporulation-specific biochemical functions. *Curr. Microbiol.* **41**: 187-191.
  30. Zouari N., Dhouib A., Ellouz R. and Jaoua S. (1998). Nutritional requirements of strain of *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* and use of gruel hydrolysate, for the formulation of a new medium for delta-endotoxin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **69**: 41-52.
  31. Rivera D. (1999). Growth kinetics of *Bacillus thuringiensis* batch, Fed Batch and continuous bioreactor cultures. Ph.D Dissertation, The University of western Ontario, Canada. 210 pages.
  32. Cunha C.C.F., Maior A.M.S. and Junior M.B.S. (1998). Simulation investigations towards the development of a bacterial biopesticide Fed Batch Reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **15**: 34-47.

33. Cunha C.C.F. and Junior M.B.S. (2001). Comparison of biomass estimation techniques for *Bacillus thuringiensis* fed batch culture. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* **18:** 56-70.
34. Feng K.C., Liu B.L., Chan H.S. and Tzeng Y.M. (2001). Morphology of parasporal endotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* sp. *Kurstaki* isolate A3-4. *World journal of Microbiology and biotechnology.* **17:** 119-123.
35. Arora N., Tarannum A., Rajagopal R. and Bhatnagar R.K. (2003). A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **307:** 620–625.
36. Rivera D., Margaritis A. and De Lasas H. (1999). A Sporulation Kinetic Model for Batch Growth of *Bacillus Thuringiensis*. *Can. Journ. Chem. Eng.* **77:** 903-910.
37. Zouari N., Achour O. and Jaoua S. (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermentors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* **77:** 877-882.
38. LeBlanc M.E. (2004). Effets des différentes stratégies et pré-traitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*,. M.Sc thesis, INRS-ETE, University of Quebec, Canada. 164 pages.
39. Tyagi R.D., Sikati Foko V., Barnabé S., Vidyarthi A., and Valéro J.R. (2002). Simulanous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Science and Technology.* **46:** 247-254.
40. USEPA (1994). A plain English guide to the EPA part 503 biosolids rule. EPA/832/R-93/003, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
41. MENV (2004). Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes : Critères de références et normes réglementaires. Direction du milieu rural, environnement Québec, Canada. 138 pages.
42. Oleszkiewicz J.A., and Mavinic D.S. (2001). Wastewater biosolids: an overview of processing, treatment, and management. *Can. J. Civ. Eng.* **28:** 102-114.
43. Valéro J.R., Mohammedi S., Payne N.J., and Tyagi R.D. (1999). Microbial control of defoliating forest insects. *Recent Res. Devel. Microbiology.* **3:** 455-464.

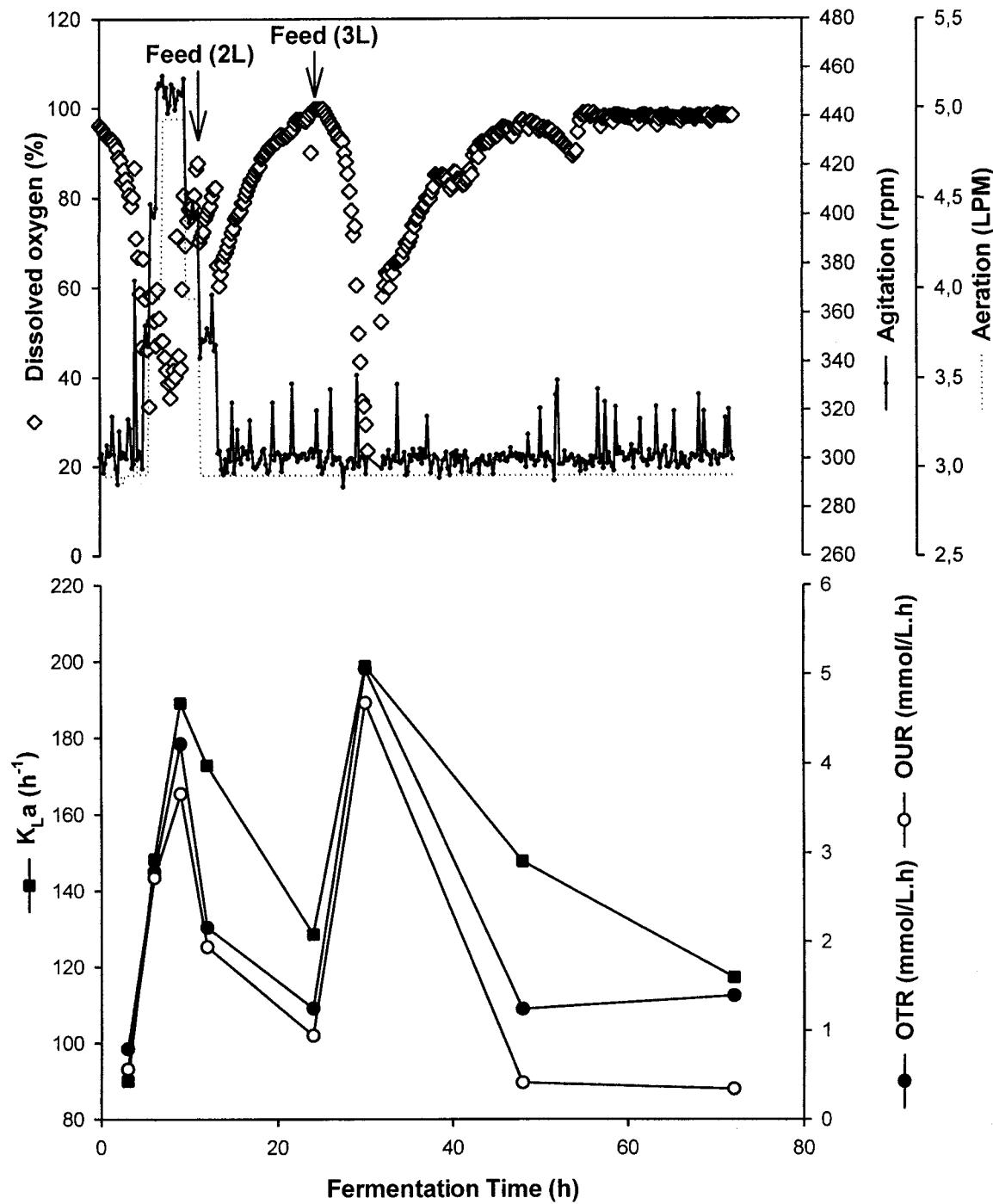
**Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary wastewater sludge**

Characteristics	Concentrations
<i>Physical Characteristics</i>	
Total Solids (TS) (g/L)	28
Volatile Solids (VS) (g/L)	17
Suspended solids (SS) (g/L)	25
Volatile suspended solids (VSS) (g/L)	16
pH	5.5
<i>Chemical Characteristics</i>	
Total carbon (%, dry TS)	41.0
Total nitrogen (%, dry TS)	4.95
Ammonia nitrogen (mgN/kg)	673
Total Phosphorus (mgP/kg)	12 231
Orthophosphates (mgP/kg)	7 356
<i>Metals (in mg/kg)</i>	
Al <sup>3+</sup>	13 323
Ca <sup>2+</sup>	16 090
Cd	3.4 (3-10)*
Cr	89 (210)*
Cu <sup>+</sup>	252 (400)*
Fe	10 471
Mg	1 796
Mn	194
K <sup>+</sup>	1 761
Pb	62 (150)*
Zn	578 (700)*

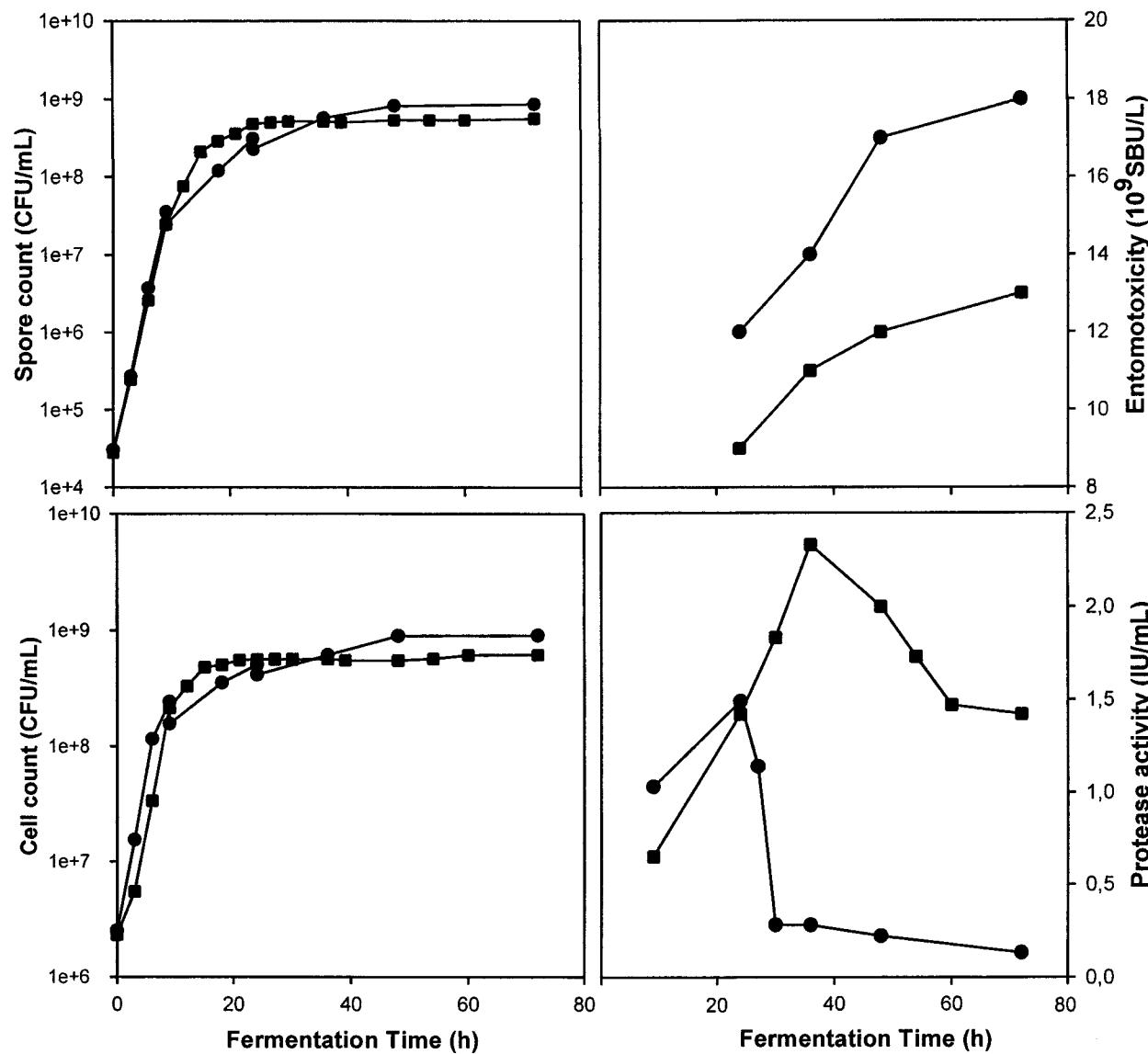
\* Digits in parenthesis represent concentrations of metals prescribed by the Quebec environment Ministry<sup>41</sup> for agriculture application.

**Table 2. Performance of the Bt process in batch and fed batch cultures after 72h growth**

Culture mode	Batch	Fed batch
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.436	0.567
Cell count (cfu/mL)	6.17x10 <sup>8</sup>	9.07x10 <sup>8</sup>
Spore count (cfu/mL)	5.62x10 <sup>8</sup>	8.60x10 <sup>8</sup>
% sporulation	91	95
Entomotoxicity (10 <sup>9</sup> SBU/L)	13	18



**Figure 1: Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration,  $K_{La}$ , OTR and OUR in fed batch culture**



**Figure 2:** Cell and spore count, protease activity and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in batch (■) and fed batch culture (●) using secondary wastewater sludge (SS= 25g/L)

## **Partie II**

### **Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of *Bacillus thuringiensis* using Different Raw Materials**

**A.Yezza<sup>1</sup>, R.D. Tyagi<sup>1</sup>, J.R. Valéro<sup>1,2</sup>, R.Y. Surampalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

*Canadian Journal of Microbiology. Submitted*



## **Influence du contrôle du pH sur le potentiel entomotoxique de *Bacillus thuringiensis* en utilisant divers substrats de fermentation**

### **Résumé**

Dans cette étude, l'hydroxyde d'ammonium et l'acide acétique ont été utilisés comme agents neutralisants durant la fermentation de *Bacillus thuringiensis* en utilisant comme substrat de fermentation deux boues d'épuration provenant de deux stations d'épuration d'eaux usées municipales différentes (CUQS et JQS) et un milieu synthétique à base de farine de soja. Indépendamment du milieu de culture, une augmentation significative du compte de cellules et de spores, de l'activité protéolytique, ainsi que de l'activité insecticide a été observée, à la fin de la fermentation, lors du contrôle du pH par NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. Le compte total des cellules s'est amélioré d'environ 17%, 33% et 25%; l'activité protéolytique a augmenté de 12%, 33% et 53%; quant au compte maximal des spores, une amélioration de 28%, 48% et 33% a respectivement été obtenue dans CUQS, dans JQS et dans le milieu synthétique, en remplaçant NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. Le potentiel entomotoxique a augmenté de 22%, 21% et 14% respectivement dans CUQS, JQS et dans le milieu soja comparé aux résultats obtenus lors du contrôle de pH avec NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Une haute activité entomotoxique a été observée dans les boues comparé au milieu à base de soja. Cette amélioration de la performance du procédé résulte de l'addition de sources de carbone et d'azote facilement assimilables à travers le contrôle de pH, ce qui stimule la production d'endotoxines dans les cristaux et permet une meilleure maturation des spores.

**Mots clés:** *Bacillus thuringiensis*, Boues d'épuration, Contrôle de pH, Sporulation, Entomotoxicité.

## **Abstract**

In this investigation, ammonium hydroxide and acetic acid were used as pH control agents during *Bacillus thuringiensis* fermentation in a pilot scale fermentor (150L) employing two secondary wastewater sludges from two different wastewater treatment plants (CUQS and JQS) and semi-synthetic soybean meal as raw materials. Regardless of the cultivation medium, a sizable increase in total cell count, spore count, protease activity and entomotoxicity was achieved when pH of the culture was controlled using NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. At harvest, total cell count increased by almost 17%, 33% and 25%; protease activity was enhanced by 12%, 33% and 53% and maximal spore count increased by almost 28%, 48% and 33% in CUQS, JQS and soybean medium, respectively. Entomotoxicity potency was improved by 22%, 21% and 14% in CUQS, JQS and soybean medium, respectively compared to results obtained with NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents. A higher entomotoxicity was also observed using sludge compared to the soybean medium. This improvement of the Bt process performance was a consequence of the addition of rapidly utilizable carbon and nitrogen source through pH control which stimulated endotoxin production in the crystal and helped spore to mature properly.

**Keywords :** *Bacillus thuringiensis*, Wastewater sludge, pH control, Sporulation, Entomotoxicity.

## **1. INTRODUCTION**

During the growth cycle of Bt, remarkable changes in the fluxes of the central metabolism of *Bacillus thuringiensis* were recorded (Sachidanandham *et al.* 1997; Starzak and Bajpai 1991; Luthy *et al.* 1982). These metabolic states are directly controlled by fermentation conditions, like oxygen transfer, pH control and composition of culture medium (Rodriguez and De La Torre 1995; Rowe and Margaratis 1994).

In batch culture, during the vegetative growth phase, nitrogen and carbon sources are catabolized via the Embden-Meyerhof-Parnas pathway with major intermediates like acetate, and other metabolic intermediates. The latter are metabolized during the transition and sporulating phase, via the TCA cycle (Benoit *et al.* 1990). Continuous control of pH during fermentation is required to prevent cell injuries and death caused by prolonged exposure to pH fluctuations. The culture pH strongly affects many enzymatic processes and the transport of various components across the cell membrane (Moon and Parulekar 1991). *Bacillus thuringiensis* growth is not influenced significantly at pH between 5.5 and 8.5. However, during sporulation, neutral conditions are preferable (Braun 2000; Bernhard and Utz 1993).

Previous research in our laboratory has shown that wastewater sludge contains the necessary nutritional elements to sustain growth, sporulation and crystal formation by *Bacillus thuringiensis* (Vidyarthi *et al.* 2002; Lachhab *et al.* 2001). However, in such complex media, the presence of nutrient is not always enough to obtain good entomocidal activity (Tirado-Montiel *et al.* 2001). Many authors have proposed to enrich the cultivation medium with extra carbon and nitrogen sources to increase the entomotoxicity potential (Yang and Wang 2000; Zouari and Jaoua 1999).

Ammonium ions are a good nitrogen source for bacilli (Fisher 1999). Zouari *et al.* (1998) demonstrated that in a gruel hydrolysate based medium, a combination of amino acids sources and ammonium sulphate significantly enhanced bioinsecticide production. Ozkan *et al.* (2003) found that addition of ammonium ions ( $\text{NH}_4^+$ ) during exponential growth could have an important influence over  $\delta$ -endotoxin production and sporulation. However, a strong negative impact on toxin yield was observed by the addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at the beginning of the sporulation phase (Yang and Wang 2000). During the sporulation phase, carbon sources are

needed in order to provide energy for spore maturation and crystal synthesis (Farrera *et al.*, 1998; Zouari *et al.*, 1998; Mignone and Avignone-Rossa 1996).

Accordingly, we attempted to control pH during Bt growth utilizing ammonium hydroxide and acetic acid as neutralizing agents using different growth media (different wastewater sludges, and semi-synthetic soybean medium). The aim of this research was, thus, to investigate the effect of such pH control on Bt process performance using different wastewater sludges and a semi-synthetic soybean medium.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### Strain and fermentation medium

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Btk) was used in this study.

In this work three types of media were used, two secondary sewage sludges and a commercial medium based on soybean meal that served as control. The composition of the commercial medium was as follows (g/L): soybean meal, 15.0; glucose, 5.0; starch, 5.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.3; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.02; Zn SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.02; CaCO<sub>3</sub>, 1.0. Wastewater secondary sludge was sampled from two different municipal wastewater treatment plants located in Quebec (CUQS) and in Jonquiere (JQS). Their chemical and physical characteristics are presented in Table 1.

### Inoculum preparation

The inoculum was prepared in a two-step process as reported by Lachhab *et al.* (2001). All the media used for inoculum preparation were adjusted to pH 7 before autoclaving. Aliquots of bacteria from a slant were used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterilized TSB (Tryptic Soy Broth, 3% (w/v), Difco). After 8-12h of incubation in a rotary shaker at 30 °C and 250 rpm (revolution per minute), a 2% (v/v) inoculum of this broth was used as seed culture to inoculate 1000 mL Erlenmeyer flasks containing 300mL of the same medium as used in the fermentor for Bt production. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 30°C and at 250 rpm for about 8-12h. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

### **Fermentation procedure**

Fermentation experiments were conducted in a pilot scale bioreactor (150L of total capacity) with a 100L working volume equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The computer program used (Fix 3.5, Intellution, USA) allowed for automatic set-point control and registration of all stated parameters.

Before each sterilisation cycle, the pH-electrode was calibrated using buffers of pH 7 and 4 (VWR-Canada). The dissolved oxygen (DO) probe was calibrated to zero (with 1 N sodium sulphite solution) and 100% (saturated with air). Cultivation medium was added to the fermentor and polypropylene glycol (0.1%, v/v, PPG, Sigma-Canada) solution was added to control the foam during sterilization. The fermentor content was sterilised *in situ* at 121°C for 30min. After sterilisation, fermentor was cooled to 30°C. The DO probe was recalibrated to zero by sparging N<sub>2</sub> gas and 100% saturation by sparging air at maximal agitation rate (150rpm). The cultivation medium was then inoculated (2%, v/v, inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. The agitation speed (100-150 rpm) and aeration rate (0.3-0.5 vvm) were varied in order to keep the dissolved oxygen (DO) value above 30% of saturation, which ensured the oxygen concentration above the critical level.

Fermentation pH was controlled automatically at 7±0.1 through computer-controlled peristaltic pumps by addition of either sterile sodium hydroxide solution (NaOH, 4N)/sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6N) or concentrated ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH, 30%)/acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH, 10N). Samples were collected periodically to monitor the changes in viable cell and spore counts, proteolytic activity and entomotoxicity potency (Tx).

### **Analytical methods and bioassay**

The titter of total cell and spore counts was estimated by counting colonies grown on TSA (tryptic Soy agar). For all counts, an average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30–300 colonies were counted per plate. The results were expressed as colony forming units per mL (cfu/mL). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same

time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated into three different plates, the colonies were counted, and the standard deviation was calculated. The standard deviation thus calculated was 6%.

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) of the minor modifications. One proteolytic activity unit (IU: international unit) was defined as the amount of enzyme preparation required to liberate 1 µmole (181µg) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. Statistical treatment of the results showed a maximal deviation of 5%.

The entomotoxicity potency of the samples was measured by the artificial diet incorporation bioassay (Beegle, 1990) as the relative mortality to Eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) which are responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray 76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). It was found that the SBU values reported in this research were 20-25% higher than the IU values measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Standard deviation for the entomotoxicity measurement was less than 5%.

The volumetric oxygen transfer coefficient ( $K_{La}$ ) measurement was based on the dynamic method (Aiba *et al.*, 1973). This technique consists in interrupting the air input. Afterwards, the aeration is re-established. The decrease and the increase in DO concentration were recorded.  $K_{La}$  was determined from the mass balance on DO just after sampling of the fermentation broth.

During batch fermentation, the mass balance for the DO concentrations could be written as follows:  $\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$

OTR: represents the oxygen transfer rate from the gas phase to the liquid phase:  
 $OTR = K_{La}(C^* - C_L)$

OUR: represents the oxygen uptake rate:  $OUR = Q_{O2} X$

$K_{La}$ : volumetric oxygen transfer coefficient

$C^*$ : oxygen concentration at saturation

$C_L$ : Dissolved oxygen concentration in the medium

$Q_{O_2}$ : specific oxygen uptake rate

X: cell concentration

Oxygen concentration in the fermentation broth was converted from % air saturation to mmol O<sub>2</sub>/L as follows: the DO electrode was calibrated in medium at 30°C and then transferred to air-saturated distilled water at known temperature and ambient pressure. This reading was used, with the known saturation concentration of oxygen at saturation in distilled water (0.07559 mmol/L) (100%), to estimate the saturation concentration of oxygen at saturation in the cultivation media at 30°C.

### **3. RESULTS AND DISCUSSIONS**

#### ***Influence of ammonium hydroxide and acetic acid as neutralizing agents on growth and sporulation***

Irrespective of neutralizing agents and cultivation media, viable cell counts increased with time, reached a maximal value towards the end of exponential growth and, thereafter, decreased until the end of fermentation due to cell lyses and spore release (Figures 1A, 2A, 3 and 4). The maximal specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) (calculated from the slope of the semi-log plot of total cell count versus time during the exponential phase) was slightly decreased (Table 2) and vegetative growth prolonged (Figures 1 and 2) by the use of ammonium nitrogen as pH control agent.

Regardless of the cultivation medium and the pH control agents, spores were detected from the beginning of growth and increased with time until the beginning of stationary phase. Maximal spore count was reached after about 24h of growth and remained almost constant until the end of fermentation.

Irrespective of cultivation media, the maximal specific sporulation rate ( $v_{max}$ ) (calculated from the slope of the straight line of the plot of total cell count v/s time on semi-log scale) was lower in case of ammonium/acetic acid than with NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents (Table 2). In other words, addition of easily metabolizable nitrogen source slowed down the spore production rate. For example for the CUQ secondary sludge, at 12h of growth (towards the end of the exponential

growth), the spore count in medium where pH was controlled by ammonium and NaOH were  $2.3 \times 10^7$  and  $1.4 \times 10^8$  cfu/mL, respectively. At that time, the Tx value obtained with NaOH/sulphuric acid as pH control agents ( $8.16 \times 10^9$  SBU/L) was almost 12% higher than that with ammonium/acetic acid ( $7.3 \times 10^9$  SBU/L) (discussed latter). This could be attributed to nitrogen catabolite repression due to additional, easily available nitrogen source (ammonium), which slowed down the sporulation process and synthesis of toxin. The presence of a high concentration of easily available nitrogen source is known to reduce the percentage of sporulating cells (Fisher 1999; Arcas *et al.*, 1987).

However, at the end of fermentation (48h), the total cell count had increased by almost 17%, 33% and 25% and maximal spore count increased by almost 28%, 48% and 33% in CUQS, JQS and soybean medium, respectively, when NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was replaced with NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (Table 2). This improvement was clearly due to the addition of easily biodegradable carbon and nitrogen sources through pH control.

#### ***Oxygen transfer during fermentation***

The variations in the dissolved oxygen concentration (DO), K<sub>La</sub>, oxygen transfer rate (OTR) and oxygen uptake rate (OUR) during fermentation of CUQ sludge using NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH as pH control agents are shown in Figures 1B and 2B, respectively. The oxygen profile could not be measured in the other cases (JQS sludge and soybean medium) due to failure of the oxygen electrode membrane system during the experiments.

For both types of neutralizing agents, during the initial stage of fermentation (first 6 and 9h of growth), a sharp decrease in DO was noticed due to higher OUR brought in by active growth of Bt (exponential growth). When the DO was very low, K<sub>La</sub>, OTR and OUR were at their maximum. Peaks were obtained after 7 and 9h, with NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH neutralizing agents, respectively. After that, for the NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> system, OUR and OTR decreased and DO increased and remained relatively constant until the end of fermentation.

However, when pH was controlled using NH<sub>4</sub>OH /CH<sub>3</sub>COOH, a second peak was observed. DO decreased again with a minimum at around 7h, giving second peaks for K<sub>La</sub>, OTR and OUR

(Figure 2B). This was due to the fact that addition of acetic acid served as a carbon source in the cultivation medium and hence growth of Bt was enhanced. Due to a suitable growth conditions spore germinated and more cells were produced which explained the second peak in DO. A similar DO pattern was observed when the fermentor was fed with extra carbon in the form of fresh sludge in a fed batch culture (Yezza *et al.* 2004).

#### ***Ammonium hydroxide and acetic acid consumption during fermentation course***

During exponential growth, alkali was injected in the cultivation medium to (neutralize the acids produced by Bt) control pH at 7.0. The consumption of NH<sub>4</sub>OH (30% solution) for JQS and CUQS wastewater sludge, was about 500mL (4 moles) and 750mL (6 moles), respectively, for 100L fermentor working volume during 48 hours fermentation, however, consumption of NaOH (4N) for JQS and CUQS wastewater sludges, was about 100mL (0.4 moles) and 250mL (1 mole) respectively, under similar conditions.

During sporulation, amino acids are consumed and pH increases, consequently acid was injected to stabilize pH at 7±0.1. Higher acetic acid consumption was also observed compared to sulfuric acid as neutralizing agent. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6N) consumption varied between 400mL (1.2 moles) and 600mL (2.8 moles), whereas, CH<sub>3</sub>COOH (10N) consumption reached 3L (30 moles) and 5L (50 moles) in JQS and CUQS sludge respectively for 100L working volume during 48 hours fermentation time. Higher consumption of acetic acid to neutralise the pH was due to two reasons: (a) acetic acid gives one mole of H<sup>+</sup> ions whereas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> furnishes 2 moles of H<sup>+</sup> ions per mole of the acid; (b) acetic acid was also consumed as easily utilizable carbon and energy source. Higher consumption of acid and alkali during fermentation of the CUQS compared to JQS sludge was probably due to the higher sludge suspended solids concentration in CUQS sludge (25g/L compared to 20g/L).

With the synthetic meduma, consumption of acid and alkali was doubled compared with the quantities consumed to control pH in CUQS sludge. This difference in acid and alkali consumption was due to the larger buffering capacity of sludge that minimized pH fluctuations (Sreekrishnan *et al.* 1993).

### ***Effect of ammonium and acetic acid as neutralizing agent on protease activity***

A similar pattern for protease activity was observed during fermentation irrespective of the cultivation medium and of the pH control agents (Figures 1A, 2A, 3 and 4). Protease activity increased with fermentation time, reached a peak and decreased thereafter until the end of fermentation. Higher protease activity was obtained using NH<sub>4</sub>OH /CH<sub>3</sub>COOH as pH control agents. Compared to results obtained with typical pH control (NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), protease activity was enhanced by 12%, 33% and 53% in CUQS, JQS and soybean medium, respectively (Table 2). This increase could be attributed to the addition of ammonium ion during exponential growth through pH control. It is known that the presence of an additional nitrogen source in the form of inorganic or organic salts produces a considerable effect on the synthesis and secretion of proteases in many bacilli (Balaban *et al.* 2003; Sinha and Satyanarayana 1991). Moreover, addition of acetic acid positively affected the protease synthesis. It has been demonstrated by Ikeda *et al.* (1974) that organic acids such as acetic acid increased protease production.

Maximal protease activity was attained between 30 and 36h of growth, except for the soybean medium using NaOH and sulfuric acid for pH control. In this case maximal protease activity was obtained after about 15h (Table 2, Figure 4). This could be due to rapid exhaustion of the easily biodegradable compounds from the soybean medium and, consequently, rapid sporulation. During the sporulation process, the intracellular proteases were released into the medium and, thus, a rapid increase in protease activity was obtained. At 15h, 75% of the cells had sporulated in the case of NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, however, only 20% of the cells had sporulated when pH was controlled with NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH. It is believed that sporulation in bacilli correlates with the synthesis of alkaline proteases (Balaban *et al.* 2003). Therefore, rapid appearance of the protease activity peak could also be due to rapid sporulation in the soybean medium when NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used as pH control agents.

Higher protease activity (3.75 IU/mL at 30h of fermentation) was recorded in CUQ secondary sludge using acetic acid and ammonium hydroxide (Table 2). The higher enzyme activity could be due to the presence of a higher concentration of complex nutrients or complex proteins supplied by the higher concentration of suspended solids in CUQ sludge (Table 1). The present results are in line with earlier reports on protease production, where it was observed that complex

carbon and nitrogen sources were better substrates for protease production than simpler sugars, which caused catabolite repression (Puri *et al.* 2002; Zouari *et al.* 2002; Tyagi *et al.* 2002).

### ***Enhancement of the entomotoxicity potency***

In all experiments, the Tx value increased more or less linearly with fermentation time (Figures 1A, 2A, 3 and 4). Irrespective of the cultivation medium, higher entomotoxicity potency was obtained at the end of fermentation when pH was controlled using acetic acid and ammonium hydroxide.

Tx value was improved by 22%, 21% and 14% in CUQS, JQS and soybean medium, respectively compared to results obtained with NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents in spite of lower  $\mu_{\max}$ . These results disagree with previous statements to the effect that higher maximal specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) in synthetic media and sludge results in higher entomotoxicity potencies at the end of fermentation (Tirado-Montiel *et al.* 2003; Vidyarthi *et al.* 2002, Liu *et al.* 1994; Kang *et al.* 1992).

The increase of entomotoxicity potency when pH was controlled by acetic acid and ammonium hydroxide was probably due to availability of rapidly utilizable nitrogen and carbon sources, which stimulated δ-endotoxin production in the crystal and helped spores to mature properly. It must be emphasised here that maximum specific growth rate was lower than with the NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> system due to inhibition of growth by the added ammonium ions during the initial phase. However, added ammonium ions along with acetic acid addition (in the later phase of growth) resulted in higher Tx values at the end of fermentation. Thus, the negative effect of a reduction of maximum specific growth rate on Tx value was off setted by the availability of higher amounts of nitrogen and carbon and consequently a net increase in Tx value.

When acetic acid was added, spores could germinate (due to availability of easily biodegradable carbon), producing more cells and consequently, more spores and toxin crystals. This corroborated our previous results (Yezza *et al.* 2004) where the culture was operated in fed batch mode by adding fresh sludge at the end of growth resulting in a 38% increase in entomocidal

potency compared to batch culture. In shake flaks, LeBlanc (2004) found that entomotoxicity potency increased by almost 53% when secondary wastewater sludge was fortified by 2g/L of glucose at the end of the exponential growth compared to non-supplemented sludge. Yang and Wang (2000) found that the toxin-protein yield could be improved by a continued glucose feed during the sporulation phase of the fermentation. In the present work, during sporulation, acetic acid was pumped into the system, thus, generating a linear gradient of nutrient, which was used as an energy and carbon source for spore maturation and crystal synthesis.

The entomotoxicity potencies were better in CUQS (25g/l of sludge suspended solids) than in JQS (20g/l of sludge suspended solids) and this provided higher availability of nutrients for the production of delta-endotoxins at the optimal value around 25 g/L (Lachhab *et al.* 2001; Sachdeva *et al.* 2000). Moreover, variations in the performance on the two types of sludge could also be directly related to the nutrient availability and complexity of the sludge, which might change, to sludge origin and to the methods used for its generation (Vidyarthi *et al.* 2002; Tirado-Montiel *et al.* 2001).

The value of specific entomotoxicity (Tx per  $10^3$  spores) was higher in sludge (Table 2) indicating that the toxin crystals produced by Bt while growing in the wastewater sludge were more toxic than that those produced in the synthetic medium. This result corroborates the previous findings of Tyagi *et al.* 2002 and of Vidyarthi *et al.* 2002). Specific entomotoxicity decreased when NH<sub>4</sub>OH and acetic acid were employed as pH control agents.

Regardless of the pH control agents, higher Tx values were obtained in sludge than those obtained with the synthetic medium based soybean meal (Table 2). This enhancement in entomocidal activity could be attributed to better spore maturation in wastewater sludge. In fact, spore maturation needs a higher amino acids content, and it seems that wastewater sludge provided a higher nutrient content compared to synthetic medium. During spore and crystal synthesis, Bt needs a higher amino acids provided by the protease hydrolysis of complex organic matter contained in sludge (Balaban *et al.* 2003). However, in synthetic media, all compound are a rapidly utilized by Bt.

#### **4. CONCLUSIONS**

Higher entomotoxicity is required at the end of the *Bacillus thuringiensis* fermentation for economic reasons. This research work successfully proposed a strategy based in feeding extra nitrogen and carbon source as pH control agents to augment the entomotoxicity potency in the final fermented broth. Replacing the conventional NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH control agents with NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH during the fermentation in different wastewater sludges and in semi-synthetic soybean medium produced the following effects: decrease of the maximal specific growth rate, decrease of the specific sporulation rate and of the specific entomotoxicity (entomotoxicity per 10<sup>3</sup> spores); substantially increase of the spores count, entomotoxicity potential and of protease activity at the end of fermentation.

#### **Acknowledgement**

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STR 202047, SCF 192190-96 and Canada Research Chair). The views and opinions expressed in this article are those of the authors.

#### **References**

- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Millis, N.F. (1973). Biochemical Engineering Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition. New York.
- Arcas, J., Yantorno, O.M. and Ertola, R., J. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnol. Lett. **9**: 105-110.
- Balaban, N.P., Sharipova, M.R., Gabdrakhmanova, L.A., Mardanova, A.M., Tokmakova, Y.S., Sokolova, E.A., Rudenskaya, G.N. and Leshchinskaya, I.B. (2003). Synthesis and Secretion of Proteinases by *Bacillus intermedius* in the Late Stages of Sporulation. Microbiology **72**: 295-299.
- Beegle, C.C. (1990). Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. In Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. Edited by L.A. Hickle and W.L. Fitch. American Chemical Society, USA, pp. 14-21.
- Benoit, T.G., Wilson, G.R. and Baygh, C.L. (1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. Lett. Appl. Microbiol. **10**: 15-18.

- Bernhard, K. and Utz, R. (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticide for experimental and commercial uses. In *Bacillus thuringiensis*, An environment biopesticide, Theory and practise. Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, pp. 255-267.
- Braun, S. (2000). Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses. In Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. Edited by A. Navon and K.R.S Ascher. CAB International 2000, pp.49-72.
- Farrera, R.R., Perez-Guevara, F. and De La Torre, M. (1998). Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**: 758-765.
- Fisher, S.H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: Vive la différence! Molecular Microbiol. **32**: 223–232.
- Içgen, Y., Içgen, B. and Ozcengiz, G. (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: I. Effects of carbon and nitrogen sources. Research Microbiol. **153**: 605-609.
- Ikeda, S., Tobe, S., Niwa, K., Ishizaki, A. and Hirose, Y. (1974). Production of alkaline protease from acetic acid. Agric Biol Chem. **38**: 2317–22.
- Kang, B.C., Lee, S.Y. and Chang, H.N. (1992). Enhanced Spore Production of *Bacillus Thuringiensis* by Fed Batch Culture. Biotechnol. Lett. **14**: 721-726.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol. **30**: 291-310.
- Lachhab, K., Tyagi, R.D. and Valero, J.R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochem. **37**: 197-208.
- Leblanc, M.E., (2004). Effets des différentes stratégies et pré-traitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, M.Sc thesis, The University of Quebec, Quebec, Canada.
- Liu, W.M., Bihari, V. and Bajpai, R.K. (1994). High Density Cultivation of Sporeformers, Annals NY. Acad. Sci. **290**: 310-325.
- Luthy, P., Cordier, J.L., Fischer, H.M. (1982). *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. In Microbial and Viral Pesticides, E. Kurstak, Ed., Marcel Dekker Inc, New York, NY, pp. 35-74.

- Mignone, C. F. and Avignone-Rossa, C. (1996). Analysis of Glucose Carbon Fluxes in Continuous Cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 78-84.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 467–83.
- Ozkan, M., Dilek, F.B., Yetis, U. and Ozcengiz, G. (2003). Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research. Microbiol.* **154**: 49-53.
- Puri, S., Beg, Q.K. and Gupta, R. (2002). Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. By Response Surface Methodology. *Current Microbiol.* **44**: 286-290.
- Rodriguez, M.M. and De La Torre, M. (1996). Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 546-550.
- Rowe, G.E. and Margaritis, A. (1994). Endocellular fatty acid composition during batch growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 503-507.
- Sachdeva, V., Tyagi, R.D. and Valéro, J.R. (2000). Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Sci. Technol.* **42**: 211-216.
- Sachidanadham, R., Kumar, I.A., Krishnan, M.R. and Jayraman, K. (1999). Mathematical model based estimation of volumetric oxygen transfer coefficient(s) in the production of proteolytic enzymes in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioprocess Eng.* **2**: 319-322.
- Sinha, N. and Satyanarayana, T. (1991). Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.* **31**: 425–30.
- Sreekrishnan, T.R., Tyagi, R.D., Blais, J.F. and Campbell, P.G.C. (1993). Kinetics of heavy metal bioleaching from sewage sludge – effects of process parameters. *Water Res* **27**:1641–1651.
- Starzak, M. and Bajpai, R.K. (1991). A Structured Model for Vegetative Growth and Sporulation in *Bacillus thuringiensis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28/29**: 699-718.
- Tirado-Montiel, M.L., Tyagi, R.D. and Valero, J.R. (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research* **35**: 3807-3816.
- Tirado-Montiel, M.L., Tyagi, R.D., Valero, J.R. and Surampalli, R.Y. (2003). Production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material: Effect of process parameters. *Water Sci. Technol.* **48**: 239-246.

- Tyagi, R.D., Sikati Foko, V., Barnabé, S., Vidyarthi, A. and Valéro, J.R. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Sci. Technol.* **46**: 247-254.
- Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D., Valero, J.R. and Surampalli, R.Y. (2002). Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* **36**: 4850-4860.
- Yang, X.M. and Wang, S.S. (2000). Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. App. Biochem.* **31**: 71-76.
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. and Surampalli, R.Y. (2004). Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material. *J. Chem. Technol.Biotechnol.* In press.
- Zouari, N., Achour, O. and Jaoua, S. (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermenters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**: 877-882.
- Zouari, N. and Jaoua, S. (1999). The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 497–502.
- Zouari, N., Dhouib, A., Ellouz, R. and Jaoua, S. (1998). Nutritional requirements of a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and use of gruel hydrolysate, for the formulation of a new medium for deltaendotoxin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **69**: 41–52.

**Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge from Communaute Urbaine de Quebec (CUQS) and Jonquiere (JQS) wastewater treatment plants.**

Characteristics	CUQS	JQS
<i>Physical Characteristics</i>		
Total Solids (TS) (g/L)	27	21
Volatile Solids (VS) (g/L)	18	12
Suspended solids (SS) (g/L)	25	20
Volatile suspended solids (VSS) (g/L)	17	11
pH	5.6	6.8
<i>Chemical Characteristics</i>		
Total carbon (%, dry TS)	37.2	32.9
Total nitrogen (%, dry TS)	4.58	4.84
Ammonical nitrogen (mgN/kg)	572	572
Total Phosphorus (mgP/kg)	11 600	7 981
Orthophosphates (mgP/kg)	6770	4648
<i>Metals (in mg/kg)</i>		
Al <sup>3+</sup>	13 000	11 253
Ca <sup>2+</sup>	18 800	19 531
Cd	3.2	0.7
Cr <sup>2+</sup>	100	121
Cu <sup>+</sup>	226	132
F <sup>2+</sup>	10 500	5892
Mg <sup>2+</sup>	2 270	1753
Mn <sup>2+</sup>	179	132
K <sup>+</sup>	2230	2469
Pb <sup>2+</sup>	69	38
Zn <sup>2+</sup>	407	439

**Table 2. Effect of two different pH control strategies on performance of the Bt process in different cultivation media at pilot scale fermentor**

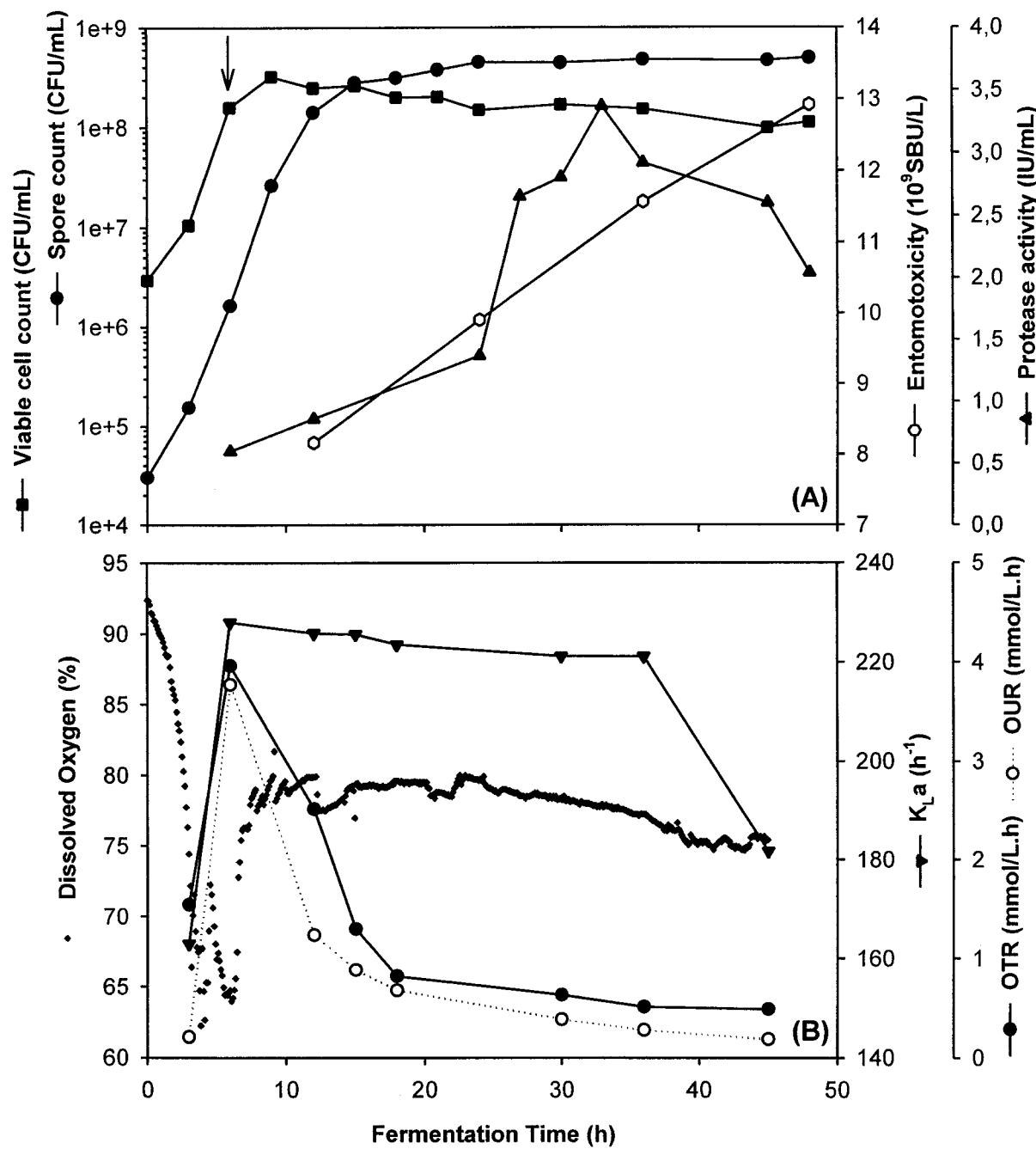
Cultivation media pH control	CUQS		JQS		Soybean	
	SA/S <sub>H</sub> <sup>1</sup>	A <sub>A</sub> /A <sub>H</sub> <sup>2</sup>	S <sub>A</sub> /S <sub>H</sub>	A <sub>A</sub> /A <sub>H</sub>	S <sub>A</sub> /S <sub>H</sub>	A <sub>A</sub> /A <sub>H</sub>
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	0.56	0.34	0.37	0.32	0.43	0.32
$v_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>	0.73	0.60	0.45	0.33	0.61	0.46
Total cell count at 48h (cfu/mL)	6.06x10 <sup>8</sup>	7.13x10 <sup>8</sup>	4.6x10 <sup>8</sup>	6.1x10 <sup>8</sup>	4.9x10 <sup>8</sup>	6.12x10 <sup>8</sup>
Viable cell count at 48h (cfu/mL)	1.13x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>7</sup>	9.3x10 <sup>7</sup>	6.7x10 <sup>7</sup>	7.3x10 <sup>7</sup>	5.6x10 <sup>7</sup>
Spore count at 48h (cfu/mL)	4.93x10 <sup>8</sup>	6.33x10 <sup>8</sup>	3.67x10 <sup>8</sup>	5.43x10 <sup>8</sup>	4.17x10 <sup>8</sup>	5.56x10 <sup>8</sup>
% sporulation at 48h	80	89	80	90	81	90
Maximal protease activity (IU/mL)	3.37 at 30h	3.75 at 30h	1.5 at 36h	2 at 30h	1.45 at 15h	2.31 at 36h
Entomotoxicity (10 <sup>9</sup> SBU/L) at 48h	12.92	15.74	11.24	13.66	9.56	10.91
Entomotoxicity/10 <sup>3</sup> spores	26.21	24.87	30.63	25.16	22.93	19.62

<sup>1</sup>SA/S<sub>H</sub>: Sulfuric acid/Sodium hydroxide

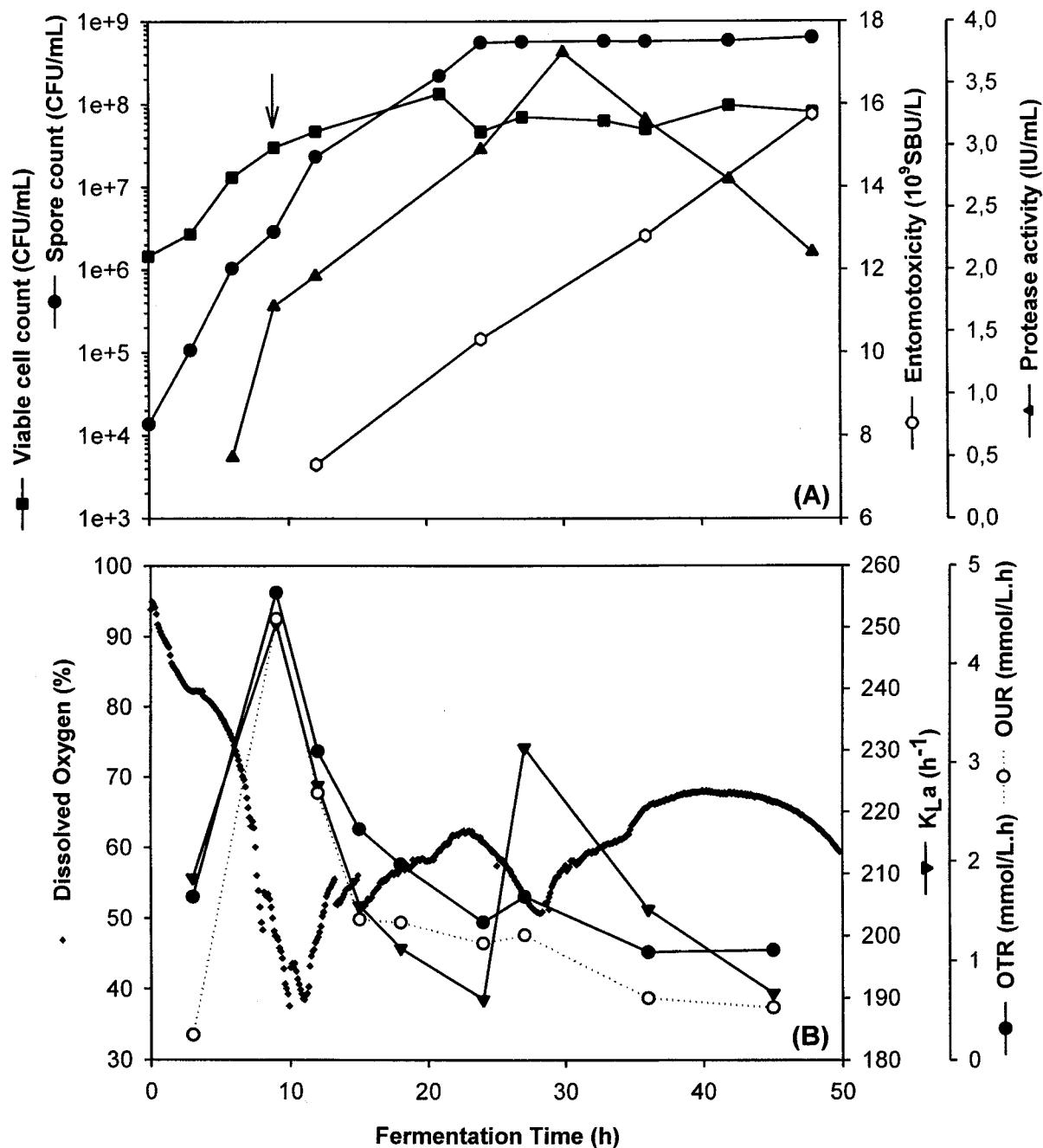
<sup>2</sup>A<sub>A</sub>/A<sub>H</sub>: Acetic acid/ammonium hydroxide

<sup>3</sup>Maximal specific growth rate

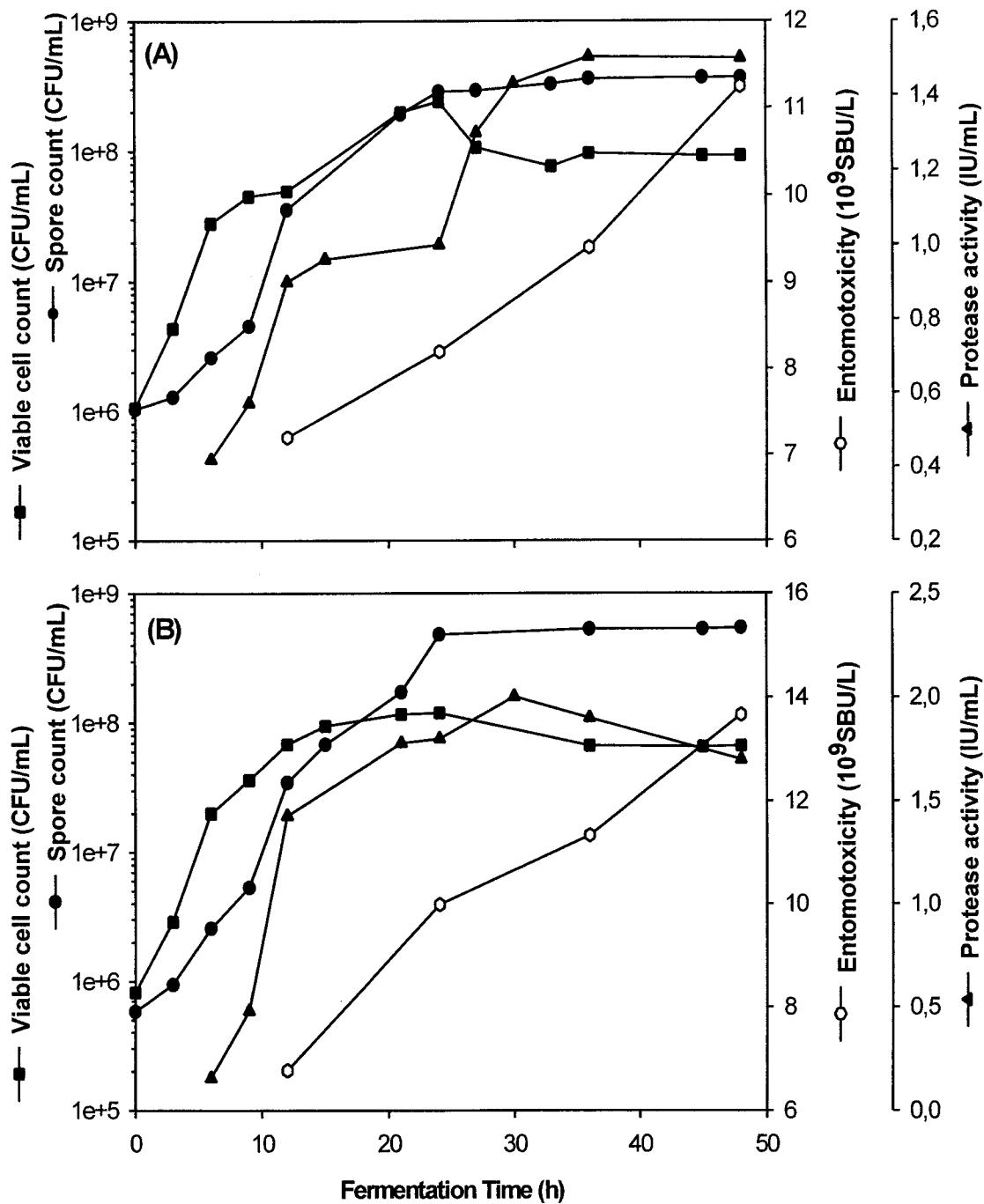
<sup>4</sup>Maximal specific sporulation rate



**Figure 1.** Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using CUQS wastewater sludge and NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents in pilot scale fermentor. (A) Viable cell and spore counts, protease activity and entomotoxicity. (B) Profiles of dissolved oxygen (DO), K<sub>La</sub>, OTR and OUR. (arrow: shift of pH control from NaOH to H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).



**Fig. 2.** Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using CUQS wastewater sludge and NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH as pH control agents in pilot scale fermentor. (A) Viable cell and spore counts, protease activity and entomotoxicity. (B) dissolved oxygen (DO), K<sub>La</sub>, OTR and OUR. (arrow: shift of pH control from NH<sub>4</sub>OH to CH<sub>3</sub>COOH).



**Figure 3.** Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using JQS wastewater sludge in pilot scale fermentor. (A) NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (B) NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH.

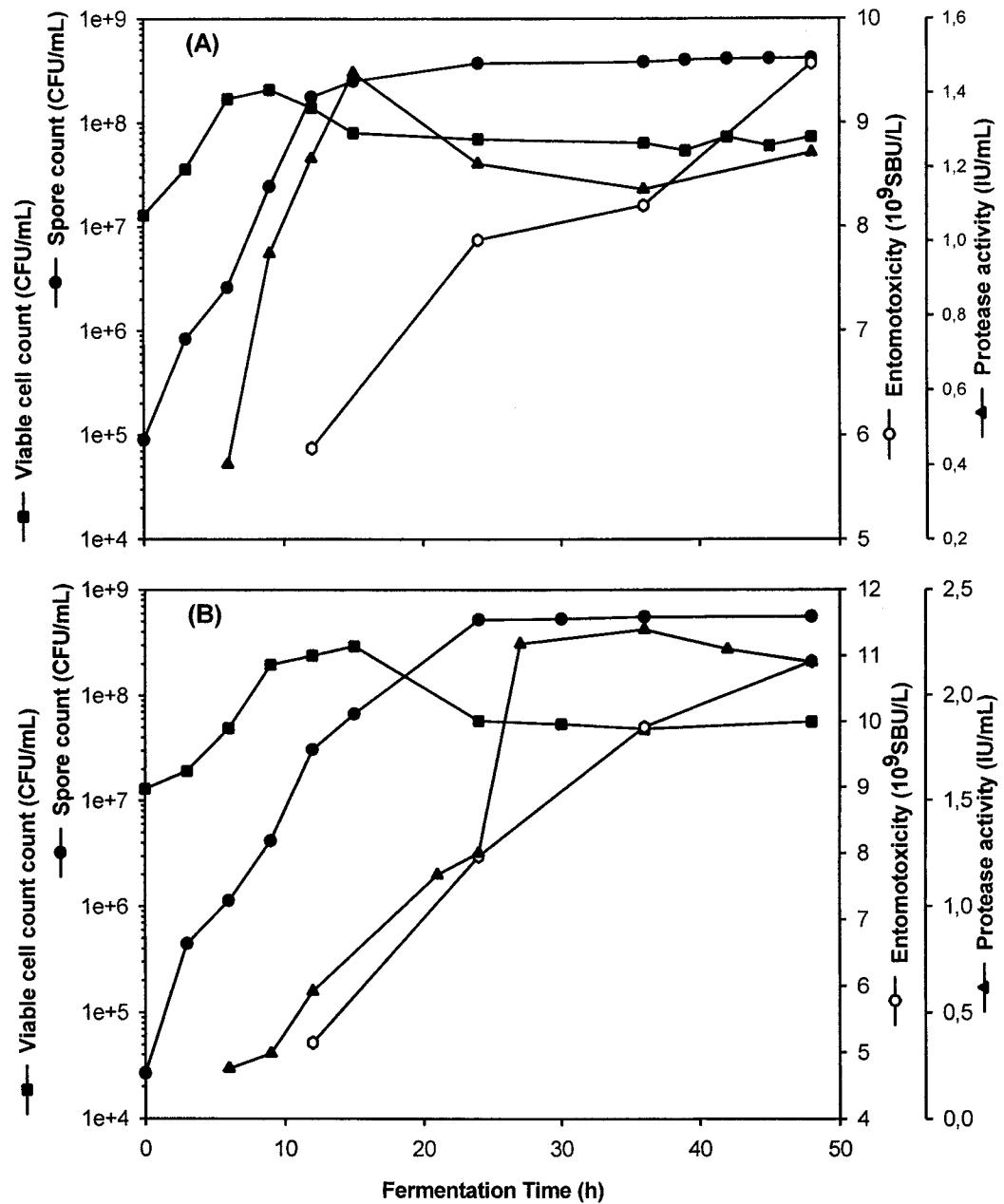


Figure 4. Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using soybean meal based medium in pilot scale fermentor. (A)  $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$  and (B)  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ .

## **Partie III**

### **Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***

**A.Yezza<sup>1</sup>, R.D. Tyagi<sup>1</sup>, J.R. Valéro<sup>1,2</sup>, R.Y. Surampalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

*World Journal of Microbiology and Biotechnology. Submitted*



## **Amélioration du potentiel entomotoxique produit par *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* par pré-traitement des boues**

### **RÉSUMÉ**

Les milieux de culture complexes tels que les boues d'épuration municipales nécessitent une étape de pré-traitement afin d'hydrolyser la matière organique complexe en nutriments facilement assimilables par Bt. Dans cette étude deux types de pré-traitement sur les boues ont été réalisés : une hydrolyse thermo-alcaline et un traitement oxydative. Le pré-traitement thermo-alcalin des boues se révèle être une technique efficace pour améliorer les performances du procédé de production de Bt dans les boues d'épuration. Le compte de cellules totales et celui des spores ont été respectivement augmentés de 40% et 46% en comparaison aux boues non pré-traitées. Le potentiel entomotoxique à la fin de la fermentation est passé de  $12,3 \times 10^9$  SBU/L dans les boues non-traitées à  $16,6 \times 10^9$  SBU/L dans les boues pré-traitées. Cette amélioration du potentiel entomotoxique pourrait être attribuée à un meilleur transfert d'oxygène en raison d'une diminution de la viscosité, et une amélioration de la disponibilité des nutriments suite à la solubilisation de la matière organique complexe présente dans les boues.

**Mots clés:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Boues d'épuration; Pré-traitement thermo-alcalin, Sporulation, Entomotoxicité, PHB, Sporulation, Protéase.

## **ABSTRACT**

Wastewater sludge is a complex raw material for fermentation and requires pre-treatment in order to convert less biodegradable compounds into more easily degradable ones. In this study, sludge was treated by thermo-alkaline and oxidative pre-treatment methods and subjected to *Bacillus thuringiensis* fermentation in bench scale fermentors under controlled conditions. The thermo-alkaline treatment was found to be an effective process in order to enhance entomotoxicity against spruce budworm. The total cell and spore counts were improved by 40% and 46%, respectively as compared to that using the untreated sludge. The final entomotoxicity potency increased from  $12.3 \times 10^9$  SBU/L for the raw sludge to  $16.6 \times 10^9$  SBU/L for thermo-alkaline pre-treated sludge. The improvement in process performance was attributed to better oxygen transfer due to decreased medium viscosity and to an improvement in nutrient availability due to the sludge solubilization and biodegradability.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Wastewater Sludge, Thermo-alkaline Pre-treatment, Sporulation, Entomotoxicity, PHB, Sporulation, Protease

## 1. INTRODUCTION

The production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* based biopesticides using wastewater sludge as raw material was successfully achieved in our laboratory (Tirado-Montiel *et al.* 2003; Vidyarthi *et al.* 2002; Tirado-Montiel *et al.* 2001; Lachhab *et al.* 2001; Vidyarthi *et al.* 2001; Sachdeva *et al.* 2000). Nevertheless, efficiency of the process depends on the entomotoxicity potential at the end of the fermentation.

The limiting factor in achieving higher entomotoxicity potential is the availability of biodegradable organic matter in sludge. In fact, wastewater sludge is a complex and heterogeneous material containing different types of biodegradable organic matter that has been classified as easily biodegradable, biodegradable, difficult-to-biodegrade and non-biodegradable (Tirado-Montiel *et al.* 2003; Neyens *et al.* 2003a).

The demand for higher process efficiency has prompted the need for sludge pre-treatment methods in order to improve substrate solubilization and biodegradability. Sludge hydrolysis improves the quality of the sludge. Different techniques have been tested to increase the biodegradability of difficult to biodegrade material that constitute wastewater sludge (Ben Rebah *et al.* 2001; Sachdeva *et al.* 2000). The influence of thermo-chemical pre-treatment on several sludge characteristics has been extensively reviewed in literature (Vlyssides & Karlis 2004; Neyens & Baeyens 2003; Neyens *et al.* 2003a,b).

Several methods of sludge pre-treatment such as thermal and chemical treatments by acidification, alkaline or peroxide hydrolysis have been introduced in our laboratory to stimulate Bt growth, and to maximize sporulation and crystal formation, using wastewater sludge as a raw material (Barnabé, 2004; LeBlanc, 2004; Tirado-Montiel *et al.* 2003; Tirado-Montiel *et al.* 2001). It was demonstrated that sludge hydrolysis is one way to breakdown the larger molecules into smaller ones and thus, at improving the rheology of sludge, providing better nutrient assimilation for Bt based biopesticides production (Brar *et al.* 2004). All this work was done in shake flasks and the sludge hydrolysis was performed in a microwave oven.

The main objective of this study was to determine the potential of using thermo-alkaline and oxidative pre-treated sludges for production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. The studies were conducted in a fermentor under controlled parameters.

Entomotoxicity potency depends on many factors such as spore concentration, crystal quality and quantity, protease production and poly- $\beta$ -hydroxy butyric acid (PHB) accumulation. Several publications have discussed the importance of PHB production and consumption on the final entomotocidal activity. The stored PHB is used as an energy source for spore and crystal protein synthesis during sporulation (Popovic *et al.* 2001; Mignone & Avignone-Rossa 1996; Starzak & Bajpai 1991). Therefore, one of the objectives of this research was to study accumulation and degradation of PHB during Bt fermentation using either raw or hydrolysed sludge.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. *Bacillus thuringiensis* strain**

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar slants plates [TSA: 3.0% Tryptic Soya Broth (Difco)+1.5% Bacto Agar (Difco)], incubating at 30°C for 48 hr and then storing at 4°C for future use.

### **2.2. Inoculum preparation**

The inoculum was prepared in two-step process as reported by Lachhab *et al.* (2001). All the media used for inoculum preparation were adjusted to pH 7.0± 0.1 before autoclaving. Aliquots of bacteria from the slant were used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterilized TSB (Tryptic Soy Broth, 3% v/v, Difco). After 8-12 h incubation in a rotary shaker at 30 °C and 250 rpm (revolution per minute), a 2% (v/v) inoculum of this broth was used as seed culture to inoculate 500mL Erlenmeyer flask containing 100 ml of the same medium as used in the fermentor for Bt production. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 30°C and 250 rpm for about 8-12 h. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

### **2.3. Sludge pre-treatment**

Wastewater secondary sludge was sampled from a municipal wastewater treatment plant located in Quebec City (Canada). The sludge was divided into three parts. Bt fermentation was conducted on raw sludge and on pre-treated sludge samples:

- Raw sludge: the secondary sludge was settled by gravity to increase the suspended solids concentration to 20g/L.
- Thermo-alkaline pre-treatment of sludge: the concentrated sludge (35g/L suspended solids concentration) was adjusted to pH 10 by adding sodium hydroxide (10N). Thermo-alkaline pre-treatment was conducted in 10L working volume hydrolyser at 100 rev/min speed stirrer and 140°C during 30 min. Thermal energy was conveyed into the sludge by direct steam injection. Steam injection provided direct thermal contact with the sludge; however, it increased sludge volume owing to condensation of part of the injected steam and reducing the suspended solids (SS) concentrations to 20g/L.
- Oxidative pre-treatment of sludge: This pre-treatment step was conducted according to LeBlanc (2004) using hydrogen peroxide at a final concentration of 0.02 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % v/v solution) per g of sludge suspended solids. Oxidation was done directly in the fermentor at 70°C and at 100 rev/min for two hours.

The chemical and physical characteristics of the wastewater sludge used are presented in Table 1. The physical characteristics of wastewater sludge in terms of total sludge solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods (APHA, 1989). The total carbon and total nitrogen in wastewater sludge were analysed using an NA 1500-NCS analyser (Carlo Erba Instrument). Other chemical components in the sludge like ammonia nitrogen, total phosphorus and orthophosphate as PO<sub>4</sub> were determined by Technicon Analyser II (Technicon Instruments Corporation, New York). Metal concentrations (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Mg, and Ca) were analysed by atomic absorption spectrometer (Spectra AA-20, Varian Techtron Pty. Ltd., Australia).

## **2.4. Fermentation procedure**

Fermentation experiments were conducted in a bench scale bioreactor (15L, total capacity) equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The computer program (Fix 3.5, Intellution, USA) used allowed automatic set-point control and recording of all stated parameters.

The tested sludge, with or without pre-treatment was added in the fermentor (10L of working volume) and polypropylene glycol (0.1% v/v solution, PPG, Sigma-Canada) was added to control foaming during sterilization. The fermentors were sterilised *in situ* at 121°C for 30 min. After sterilisation, fermentors were cooled to 30°C. The fermentor was then inoculated (2%, v/v, inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. The agitation speed (300-500 rev/min) and aeration rate (0.3-0.5 vvm-litre of air/litre of fermentor content/minute) were varied in order to keep the dissolved oxygen (DO) values above 30% of saturation, which ensured an oxygen concentration above the critical level. The pH was automatically controlled at 7.0± 0.1 using either sterile solutions of sodium hydroxide (NaOH, 4N) or sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6N) through computer-controlled peristaltic pumps. Samples were collected periodically to monitor the changes in viable cell and spore count, PHB content, protease activity and entomotoxicity potency (Tx).

## **2.5. Analytical Methods and Bioassays**

The titers of viable cells and spores were estimated by counting colonies grown on TSA (Tryptic soy agar). For all counts, the average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30–300 colonies were counted per plate. The results were expressed as colony forming units per ml (c.f.u/ml). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated in three different plates and the colonies were counted and the standard deviation was calculated using Microsoft Excel's built-in STDEV function ("nonbiased" or "n<sup>-1</sup>" method). The standard deviation thus calculated was 6%.

Protease activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. One proteolytic activity unit (IU, International Unit) was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmole (181µg) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. In order to check the reproducibility of the enzyme measurement, 10 samples were collected (at the same time) from a shake flask experiment. The samples were appropriately diluted and enzyme activity was determined in individual samples followed by the calculation of standard deviation. The statistical treatment of the results using Microsoft Excel's built-in STDEV function showed maximum deviations of 5%.

Extraction of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) was carried out according to Comeau *et al.* (1988). The amount of PHB was determined using a gas chromatograph (Varian Model 3800) equipped with capillary column Zebron ZB-5 (30m X 0.25 mm X 0.25µm). Poly-3-hydroxybutyrate acid (Aldrich Chemical Company, Inc) was used as a standard. PHB content (%w/w) was defined as the percentage of the ratio of PHB concentration to dry total solids.

Entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by bioassay as the relative mortality to eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray 76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). This product contains a mixture of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* at a potency of  $20.1 \times 10^9$  IU/L (International Unit) measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented sludge samples using spruce budworm larvae and cabbage looper. It was found that the SBU values reported in this research were 20-25% higher than the IU values.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method (Beegle, 1990). In this technique 1.5mL of serially decimal diluted sample was mixed into 30mL molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to correct the mortality of larvae due to the sludge. One third-instar larvae of eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for

one week and the mortality of the larvae was counted. Samples having mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. In order to calculate the standard deviation, 10 samples were drawn at the same time from shake flask experiment and the entomotoxicity was measured against spruce budworm larvae. The standard deviation was calculated using Microsoft Excel's built-in STDEV function and found to be less than 5%.

Volumetric oxygen transfer coefficient ( $K_{La}$ ) measurement was based on the dynamic method (Aiba *et al.* 1977). This technique consists in interrupting the air input. Afterwards, the aeration is re-established. The decrease and the increase in dissolved oxygen (DO) concentration were recorded.  $K_{La}$  was determined from the mass balance on DO just after sampling of the fermentation broth.

During batch fermentation, the mass balance of the DO concentrations may be written as following:  $\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$

OTR: Oxygen transfer rate from gas phase to liquid phase:  $OTR = K_{La}(C^* - C_L)$

OUR: Oxygen uptake rate:  $OUR = Q_{O_2} X$

$K_{La}$  : Volumetric oxygen transfer coefficient

$C^*$ : Saturated oxygen concentration

$C_L$ : Dissolved oxygen concentration in the medium

$Q_{O_2}$ : Specific oxygen uptake rate

X: Cell concentration

Oxygen concentration in the fermentation broth was converted from % air saturation to mmol  $O_2/L$  as following: The DO electrode was calibrated in the medium at 30°C and then transferred to air-saturated distilled water at known temperature and ambient pressure. This reading was used, with the known concentration of oxygen in distilled water at saturation (0.07559 mmol/L) (100%), to estimate the concentration of oxygen at saturation in the cultivation media at 30°C.

### 3. RESULTS

Evolution of the viable cell and spore counts, PHB accumulation, protease activity and entomotoxicity potency during fermentation using either raw sludge, thermo-alkaline or oxidative pre-treated sludge were illustrated in Figures 1, 2 and 3, respectively. Exponential growth (based on total cell count: vegetative cells and spores) occurred during the first 9h in thermo-alkaline and oxidative pre-treated sludge, and 15h in raw sludge (Figures 1, 2 and 3). The values for various parameters for the three types of sludge were reported in Table 2. Almost similar total cell and spore counts were observed in raw and oxidative pre-treated sludge whereas they increased by 40% and 46%, respectively in thermo-alkaline pre-treated sludge (Table 2). The reason for this increase might be due to comparatively higher maximal specific growth rate ( $\mu_{\max}$  value) (Table 2), which was calculated from the slope of the line of total cell count versus time during the exponential phase. Availability of higher amount of biodegradable carbon and nitrogen source in thermo-alkaline pre-treated sludge could be the second reason for the increased total cell and spore counts.

In raw and pre-treated sludges, Tx value increased linearly with time (Figures 1, 2 and 3). The final entomotoxicity potency (at the end of fermentation) increased from  $12.3 \times 10^9$  SBU/L for the raw sludge to  $16.6 \times 10^9$  SBU/L for the thermo-alkaline pre-treated sludge (Table 2). However, the oxidative pre-treated sludge did not lead to a substantial increase in Tx value ( $13.1 \times 10^9$  SBU/L).

For both raw and pre-treated sludges, Bt accumulated some intracellular Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) during the exponential growth. PHB content of the Bt cells increased until late exponential phase and attained a maximum after 12h in thermo-alkaline pre-treated sludge and 15h for both raw and oxidative pre-treated sludge. After that, the PHB content decreased until the end of fermentation (Figures 1, 2 and 3). The highest level of PHB accumulation was observed during fermentation of raw sludge (Table 2).

Protease activity in raw and pre-treated sludges increased with fermentation time and attained a maximum towards the end of fermentation followed by a decrease (Figures 1, 2 and 3). Protease synthesis in pre-treated sludge decreased as compared to that with raw sludge. Maximal protease activity was two fold higher in raw sludge than in the pre-treated sludges (Table 2).

The profiles for  $K_{La}$ , OTR and OUR obtained during fermentation of raw, thermo-alkaline and oxidative pre-treated sludges were illustrated in Figures 1, 2 and 3, respectively. In the three cases,  $K_{La}$ , OTR and OUR, increased in the beginning of fermentation, reached a peak towards the end of exponential growth, then decreased followed by a tendency to become constant during the rest of the fermentation. A similar trend was also observed during Bt fermentation of non-treated sludge in bench and pilot scales fermentation (Yezza *et al.* 2004a). Maximum  $K_{La}$  values were higher in the pre-treated sludge (192.9 and 157.6 h<sup>-1</sup> in thermo-alkaline and oxidative treatment, respectively) than in raw sludge (117.2 h<sup>-1</sup>).

## 4. DISCUSSIONS

### 4.1. Enhancement of entomotoxicity potency in thermo-alkaline pre-treated sludge

Higher entomotoxicity is highly desirable in the final Bt fermented broth for economic reasons. Earlier research showed that highest Tx value was achieved at sludge solids concentration of 20-25g/L (Lachhab *et al.* 2001). Further increase in solids concentration resulted in a decrease of Tx value. Therefore, sludge pre-treatment was chosen in this research to enhance the availability of nutrients and, hence, to increase the Tx value. Accordingly, the final Tx value increased by 35% compared to raw or non-treated sludge. This enhancement of Tx was attributed to **i)** a better oxygen transfer due to decrease of sludge viscosity and **ii)** to an increased availability of nutrients due to partial sludge solubilization under the thermo-alkaline condition.

Wastewater sludge has a tendency to form flocs that are broken down during sterilisation. Bt cells also get embedded in sludge solids, as the major portion of the nutrients is present in the sludge solid phase. This tendency results in severe oxygen transfer problems during Bt growth at higher sludge solids concentrations (Tirado-Montiel *et al.* 2003; Vidyarthi *et al.* 2002; Lachhab *et al.* 2001). Higher  $K_{La}$  values in pre-treated sludge compared to raw sludge could be attributed to change in the initial sludge viscosity (before the start of fermentation) due to the pre-treatment. After sludge pre-treatment, the viscosity was substantially decreased which simplified mixing and induced an increase in  $K_{La}$  values (enhanced oxygen transfer) (Muller *et al.* 2004; Kepp *et al.* 2000; Brar *et al.* 2004). As the viscosity decreased, air in the fermentor fluid became well distributed in the form of small bubbles throughout the process (Ozbek & Gayik 2001; Ozergin-

Ulgen & Mavituna 1998). The benefit of small bubbles is that they rise slowly, therefore, keeping the air bubbles in the liquid longer, allowing more time for the oxygen to dissolve (Juarez & Orejas 2001).

During pre-treatment, sludge structure underwent certain chemical and physical changes like destruction of colloidal gels, solubilization of sludge constituents (carbon and N sources), ammonification of organic nitrogen, disruption of sludge flocs and of cellular structure (Mantzavinos & Psillakis 2004; Barjenbruch & Kopplow 2003). Thermo-alkaline pre-treatment of sludge caused hydration of proteins, polysaccharides, lipids and of other intracellular macromolecules secreted from disrupted sludge cells and significantly increased the amount of dissolved organic matter from wastewater sludge (Muller *et al.* 2004; Cai *et al.* 2004; Erdincler & Vesilind 2000; Kepp *et al.* 2000). This phenomenon makes the carbohydrates, proteins and other nutrients accessible for Bt growth. In this way, difficult to degrade compounds presented in sludge were transformed into easily degradable ones. Thus, enhanced nutrient availability and biodegradability in pre-treated sludge favoured Bt growth, sporulation and entomotoxicity potency. Moreover, the sodium ions added in sludge thermo-alkaline hydrolysis could also play a major role in the membrane exchange process. Zouari *et al.* (2002) showed that addition of Na<sup>+</sup> ions in the form of sodium chloride (0.5g/L) in gruel based medium resulted in a significant increase of δ-endotoxin production.

The results obtained clearly indicated that the thermo-alkaline pre-treatment could enhance the spore count and δ-endotoxin production. LeBlanc (2004) also observed a similar trend for Tx in shake flask experiments. It was concluded that thermo-alkaline hydrolysis led to an higher Tx value as compared to raw and other pre-treated sludge. However, the Tx values observed by LeBlanc (2004) were lower than the values recorded in this study. This was due to better oxygen transfer in the fermentor compared to that obtained in shake flasks (Yezza *et al.* 2004a). Moreover, LeBlanc (2004) hydrolysed the sludge in a microwave oven without any agitation. It could be possible that direct steam injection method used in this study, provided better solubilization of the sludge, and increased markedly the soluble organic content (Chu *et al.* 2002) and hence increasing the Tx value.

Oxidative pre-treated sludge did not improve the performance to a large extent in comparison to raw sludge (Table 3). This could be due to deterioration of valuable biodegradable organic matter especially various carbon and nitrogen sources. It is well known that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a strong oxidising agent and has strong ability to mineralise organic matter to carbon dioxide and water (Mantzavinos & Psillakis 2004; Neyens *et al.* 2003b; Genç *et al.* 2002). A comparative study between thermal and oxidative pre-treatment of wastewater sludge conducted by Camacho *et al.* (2002), showed that thermal treatment mainly broke apart the micro-organisms, while the oxidative treatment destroyed the sludge flocs and disrupted the micro-organism. Thus, destruction of sludge organic matter during the oxidative treatment resulted in not increasing the Bt process performance.

The entomocidal potency at the end of fermentation increased with spore count, which corroborates previous investigations on the Bt fermentation (Yezza *et al.* 2004a,b; Tirado-Montiel *et al.* 2003; Vidyarthi *et al.* 2002; Aronson, 2002; Salamitou *et al.* 1996). Apart from synergistic spore effect, the higher Tx value at the end of the process could be due to some other entomopathogenic factors that might have contributed to better plasmid expression (Barnabé, 2004). These factors include VIP (vegetative insecticidal protein) and enzymes (protease, chitinases).

The need for electrical energy required for thermo-alkaline pre-treatment of sludge should be very low (Huag *et al.* 1983), so that the total energy balance could be positive compared to untreated sludge. However, economic analysis is required to justify gain in Tx value against the expenses incurred during sludge pre-treatment. Moreover, it was noticed that sludge pre-treatment reduced considerably the odour problems, thus an aesthetically pleasing product was obtained. Finally, it is worth to point out that enhancement of Bt process performance in thermo-alkaline pre-treated sludge depends on sludge characteristics and origin. Thus one must be very careful with sludge hydrolysis, so as not to deteriorate the valuable organic matter.

#### 4.2. PHB accumulation in raw and pre-treated sludge

It has been reported that accumulation of PHB in *Bt var. kurstaki* appears to be linked to formation of spores and crystal protein during sporulation phase (Mignone & Avignone-Rossa 1996; Benoit *et al.* 1990). Liu *et al.* (1994) showed that PHB was used as an energy source during sporulation are required for polymerization of the amino acids derived from the medium. However, Figures 1, 2 and 3 showed that PHB accumulation in sludge suspended solids increased concomitantly with spore production until 12-15h of growth. This implies that production/accumulation of PHB was higher than its degradation (to supply energy) for spore production. As the carbon sources in sludge become depleted, production/accumulation rate of PHB decreased and became lower than its degradation resulting in a net decrease in PHB concentration.

Sludge pre-treatment converted complex nitrogen source to easily biodegradable nitrogen sources, which might have suppressed PHB accumulation during fermentation of pre-treated sludge. It seemed that complex nitrogen, having low bio-availability, present in wastewater sludge, increased the yield of PHB produced by *Bt*. Yuksekdag *et al.* (2004) found that complex nitrogen sources increased the yield of PHB produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*. Moreover, PHB content increased with the C/N ratio (Table 2). Ben Rebah *et al.* (2002) also demonstrated that PHB production by *Bt* was higher in sludge (6.5% w/w at C/N=7.7) than in starch industrial wastewater (0.92%w/w at C/N=5.8). Therefore, low PHB accumulation in pre-treated sludge could also be attributed to a low C:N ratio.

In this research, no relation could be established between PHB accumulation and Tx. The lowest PHB content (1.28 %w/w) was observed with thermo-alkaline hydrolysed sludge showing the highest value of Tx. This is in contrast with previous findings on PHB production where endotoxin production was augmented at high concentration of acetate and PHB in GYS medium at the beginning of crystal formation (Liu & Tzeng 2000). A minimal level of PHB of 8% in the cells at the start of sporulation appeared sufficient for efficient sporulation and  $\delta$ -endotoxin production under carbon-limited growth conditions (Liu *et al.* 1994). This discrepancy could be explained by two reasons. Firstly, availability of carbon source in sludge seems to be limited, leading to low PHB accumulation. It is well known that bioaccumulation of PHB is favoured by

nitrogen depletion and an excess of carbon source (Ojumu *et al.* 2004). Secondly, the PHB content in sludge was calculated with respect to suspended sludge solids, which other than Bt cells also contain inert solids. Consequently, this might have artificially lowered the measured PHB content.

#### **4.3. Effect of sludge pre-treatment on protease activity**

Protease activity decreased markedly in thermo-alkaline pre-treated sludge, however, the spore count and entomotoxicity potency were significantly enhanced. This could be due to higher availability of easily and more assimilable material in treated sludge, thus, Bt did not synthesise higher amount of protease, which are required to hydrolyse the complex sludge protein molecules. These complex proteins had been hydrolysed to simpler molecules during the pre-treatment. Gupta *et al.* (2002) showed that protease synthesis was affected by rapidly metabolized nitrogen sources, such as amino acids in the medium. The higher protease activity obtained in raw sludge could be due to the presence of an higher concentration of complex nutrients or complex proteins in the raw sludge, and to a higher C/N ratio (Yezza *et al.* 2004a,b; Zouari *et al.* 2002).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair). The views and opinions expressed in this article are strictly those of authors.

#### **References**

- Abdel-Hameed, A. 2001 Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies, *World J. Microbio. Biotech.*, **17**, 857-861.
- Aiba S., Humphrey, A.E. & Millis, N.F. 1973 Biochemical Engineering Academic Press, 2<sup>nd</sup> edition, New York.
- APHA, AWWA, WPCF. 1989 Standard Methods for Examination of Waters and Wastewaters, 17<sup>th</sup> ed. *American Public Health Association*, Washington DC, USA.

- Aronson, A. 2002 Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 417-425.
- Barjenbruch, M. & Kopplow, O. 2003 Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research*, **7**, 715–720.
- Barnabé, S. 2004 Bioconversion des boues d'épuration en biopesticides : utiliser le plein potentiel nutritif du substrat pour une meilleure valeur ajoutée (entomotoxicité). Ph.D. thesis, INRS-ETE, Quebec University, Quebec, Canada.
- Beegle, CC. 1990 Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin, Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. In: Hickle L. A., Fitch W. L. (Eds.), Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*'. American Chemical Society, USA, 14-21.
- Ben Rebah, F., Filali-Meknassi, Y., Yezza, A., Tyagi, R.D. & Surampalli, R.Y. 2002 Wastewater treatment as an approach for the recovery of value added products; Water and Wastewater: Perspectives of Developing Countries, *Proceeding of the international Conference, WAPDEC*, December 11-13, New Delhi.
- Ben Rebah, F., Tyagi, R.D. & Prévost, D. 2001 Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 467–474.
- Benoit, T.G., Wilson, G.R. & Baygh, C.L. 1990 Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**, 15-18.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., & Banerji, S.K. 2004 Comparative rheology and particle size analysis of various types of *Bacillus thuringiensis* fermented sludges. *Journal of Residual Science & Technology*, **1**(4), 231-237.
- Bulla, L. A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I., Aronson, A.I. & Fitz-James, P.C. 1980 Ultrastructure, Physiology and Biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **8**, 174-204.
- Cai, M. Liu, J. & Wei, Y. 2004 Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pre-treatment. *Environment Science and Technology*, **38**, 3195-3202.
- Camacho, P., Deleris, S., Geaugey V., Ginestet, P. & Paul, E. 2002 A comparative study between mechanical, thermal and oxidative disintegration techniques of waste activated sludge. *Water Science and Technology*, **46**(10), 79-87.
- Comeau, Y., Hall, K. & Oldham, W.K. 1988 Determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and Poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2325-2327.

- Chu, C. P., Lin, W. W., Lee, D. J., Chang, B.V. & Peng, X. F. 2002 Thermal Treatment of Waste Activated Sludge Using Liquid Boiling. *Journal of Environmental engineering*, **128**, 1100-1103.
- Erdincler, A. & Vesilind, P.A. 2000 Effect of sludge cell disruption on compactibility of biological sludges. *Water Science and Technology*, **42**(9), 119–126.
- Genç, N., Yonsel, S., Dagasan L. & Onar, A. N. 2002 Wet oxidation: a pre-treatment procedure for sludge. *Waste Management* **22**, 611-616.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S. & Chauhan, B. 2002 An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**, 381–395.
- Huag, R.T., LeBrun, T.J. & Tortoria, L.D. 1983 Thermal pre-treatment of sludges- a field demonstration, *J. WPCF*, **55** (1), 23-24.
- Juarez, P. & Orejas, J. 2001 Oxygen transfer in a stirred reactor in laboratory scale. *Latin American Applied Research*, **31**, 433-439.
- Kepp, U., Machenbach, I., Weisz, N. & Solheim, O.E. 2000 Enhanced stabilization of sewage sludge through thermal hydrolysis—3 years of experience with full-scale plant. *Water Science Technology*, **42**(9), 89–96.
- Kunitz, M. 1947 Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291-310.
- Lachhab, K., Tyagi, R.D. & Valéro, J.R. 2001 Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, **37**, 197-208.
- LeBlanc, M.E. 2004 Effets des différentes stratégies et pré-traitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, M.Sc thesis, INRS-ETE, University of Quebec, Canada.
- Liu, C.M. & Tzeng, Y.M. 2000 Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(1), 11-17.
- Liu, W.M., Bihari, B. & Bajpai, R. K. 1994 High Density Cultivation of Sporeformers. *Annals NY Acad. Sci.*, **290**, 310-325.
- Mantzavinos, D. & Psillakis, E. 2004 Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 431–454.

- Mignone, C. & Avignone-Rossa, C. 1996 Analysis of carbon flux in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**, 78-84.
- Muller, J.A., Winter, A., & Strunkmann, G. 2004 Investigation and assessment of sludge pre-treatment processes. *Water Science and Technology*, **49**(10), 97-104.
- Neyens, E. & Baeyens, J. 2003 A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *Journal of Hazardous Materials*, **98**, 51–67.
- Neyens, E., Baeyens, J. & Creemers, C. 2003a Alkaline thermal sludge hydrolysis. *Journal of Hazardous Materials*, **B97**, 295–314.
- Neyens, E., Baeyens, J., Weemaes, M. & De Heyder, B. 2003b Pilot-scale peroxidation ( $H_2O_2$ ) of sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, **3977**, 1–16.
- Ojumu, T.V., Yu, J. & Solomon, B.O. 2004 Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, **3** (1), 18-24.
- Ozbek, B. & Gayik, S. 2001 The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, **36**, 729-741.
- Ozergin-Ulgen, K. & Mavituna, F. 1998 Oxygen Transfer and Uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Culture in a Batch bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **73**, 243-250.
- Popovic, M.K., Liu, W.M., Iannotti, E.L. & Bajpai R.K. 2001 Mathematical Model for Vegetative Growth of *Bacillus thuringiensis*. *Engineering Life Science*, **1**, 85-90.
- Sachdeva, V., Tyagi, R.D. & Valero, J.R. 2000 Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water science and technology*, **42**, 211-216.
- Salamitou, S., Marchal, M. & Lereclus, D. 1996 *Bacillus thuringiensis* : un pathogène facultatif. *Annales de l'institut pasteur/actualité*, **7** (4), 285-296.
- Starzak, M. & Bajpai, R.K. 1991 A Structured Model for Vegetative Growth and Sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28/29**, 699-718.
- Sharipova, M.R., Balaban, N.P., Gabdrakhmanova, L.A., Shilova, M.A., Kadyrova, Y.M., Rudenskaya, G.N., & Leshchinskaya, IB. 2002 Hydrolytic Enzymes and Sporulation in *Bacillus intermedius*. *Microbiology*, **71**, 420–424.
- Tirado-Montiel M.L., Tyagi, R.D., Valero, J.R. & Surampalli, R.Y. 2003 Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material – Effect of process parameters. *Water Science and technology*, **48**(8), 239-246.

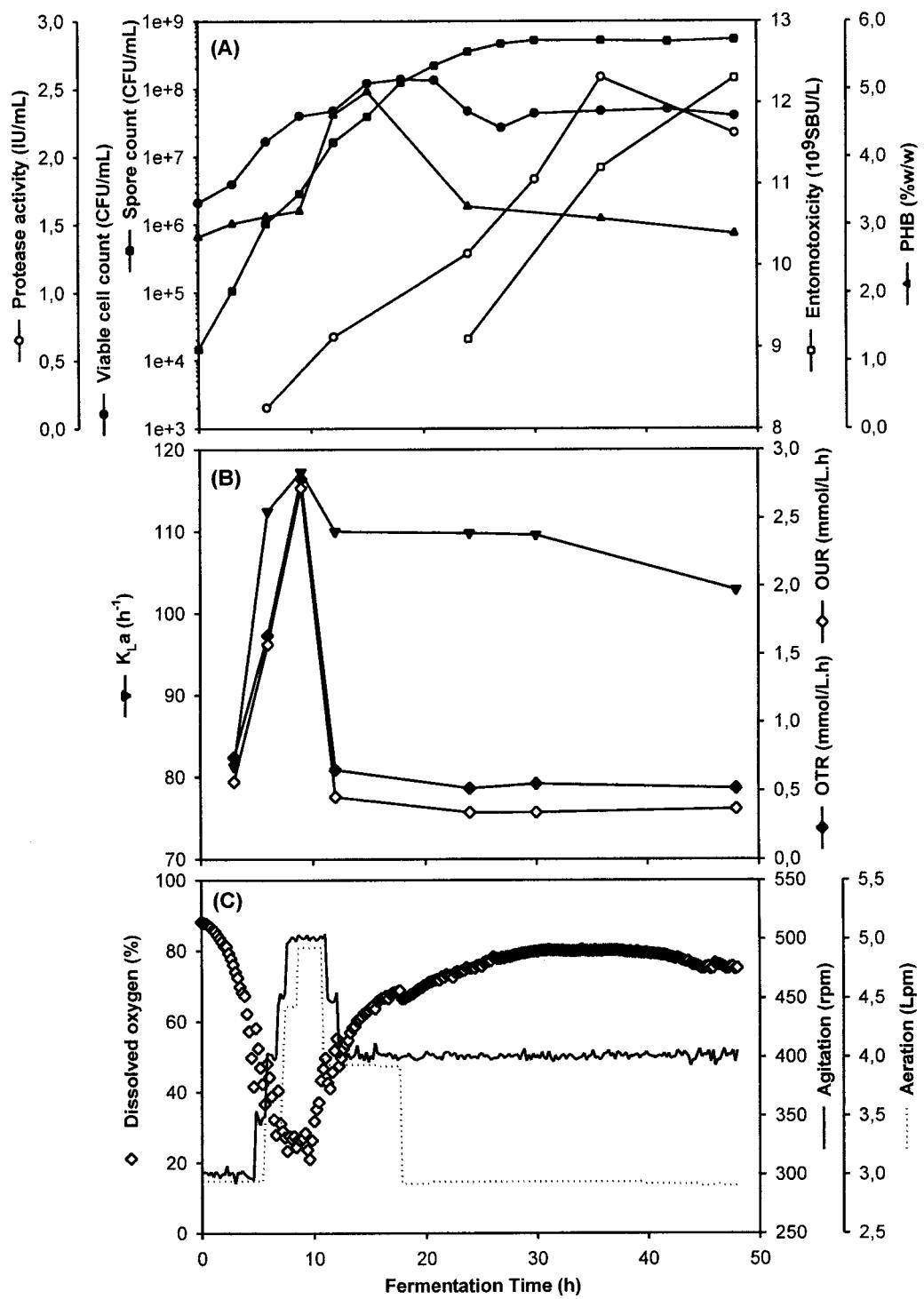
- Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D. & Valéro, J.R. 2001 Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, **44**(10), 253-260.
- Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D. & Valéro, J.R. 2001 Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research*, **35**, 3807-3816.
- Vidyarthi, A.S., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. & Surampalli, R.Y. 2002 Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, **36**, 4850-4860.
- Vlyssides, A.G. & Karlis, P.K. 2004 Thermal-alkaline solubilization of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, **91**, 201–206.
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. & Surampalli R.Y. 2004a Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. In press.
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. & Surampalli R.Y. 2004b Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. In press.
- Yuksekdag, Z., Aslim, B., Beyatli, Y. & Mercan N. 2004 Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology*, **3** (1), 63-66.
- Zouari, N., Achour, O. & Jaoua S. 2002 Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2 and 20 dm<sup>3</sup> fermentors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **77**, 877-882.

**Table 1. Physical and chemical characteristics of secondary sludge from Quebec wastewater treatment plant**

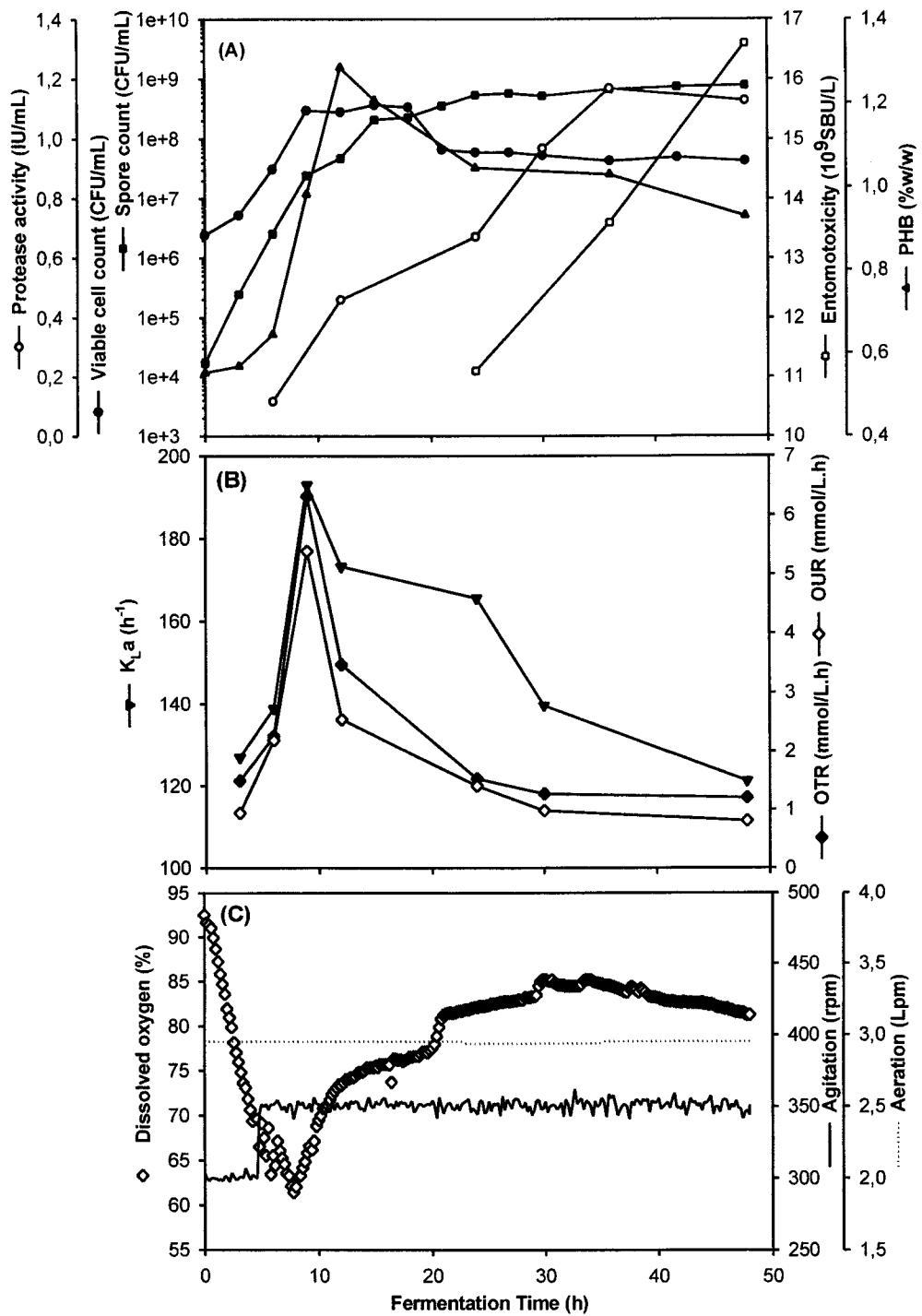
Characteristics	Concentrations
<i>Physical Characteristics</i>	
Total Solids (TS) (g l <sup>-1</sup> )	28
Volatile Solids (VS) (g l <sup>-1</sup> )	17
Suspended solids (SS) (g l <sup>-1</sup> )	20
Volatile suspended solids (VSS) (g l <sup>-1</sup> )	16
pH	5.6
<i>Chemical Characteristics</i>	
Total carbon (%, dry TS)	38.2
Total nitrogen (%, dry TS)	6.73
Ammonical nitrogen (mgN/kg)	546
Total Phosphorus (mgP/kg)	12 320
Orthophosphates (mgP/kg)	7 760
<i>Metals (in mg/kg) (dry basis)</i>	
Al <sup>3+</sup>	13 506
Ca <sup>2+</sup>	16 100
Cd <sup>2+</sup>	3.4
Cr <sup>2+</sup>	69
Cu <sup>+</sup>	259
Fe <sup>2+</sup>	10 495
Mg <sup>2+</sup>	1863
Mn <sup>2+</sup>	194
K <sup>+</sup>	1750
Pb <sup>2+</sup>	64
Zn <sup>2+</sup>	498

**Table 2.** Bt process performance on pre-treated and raw sludge

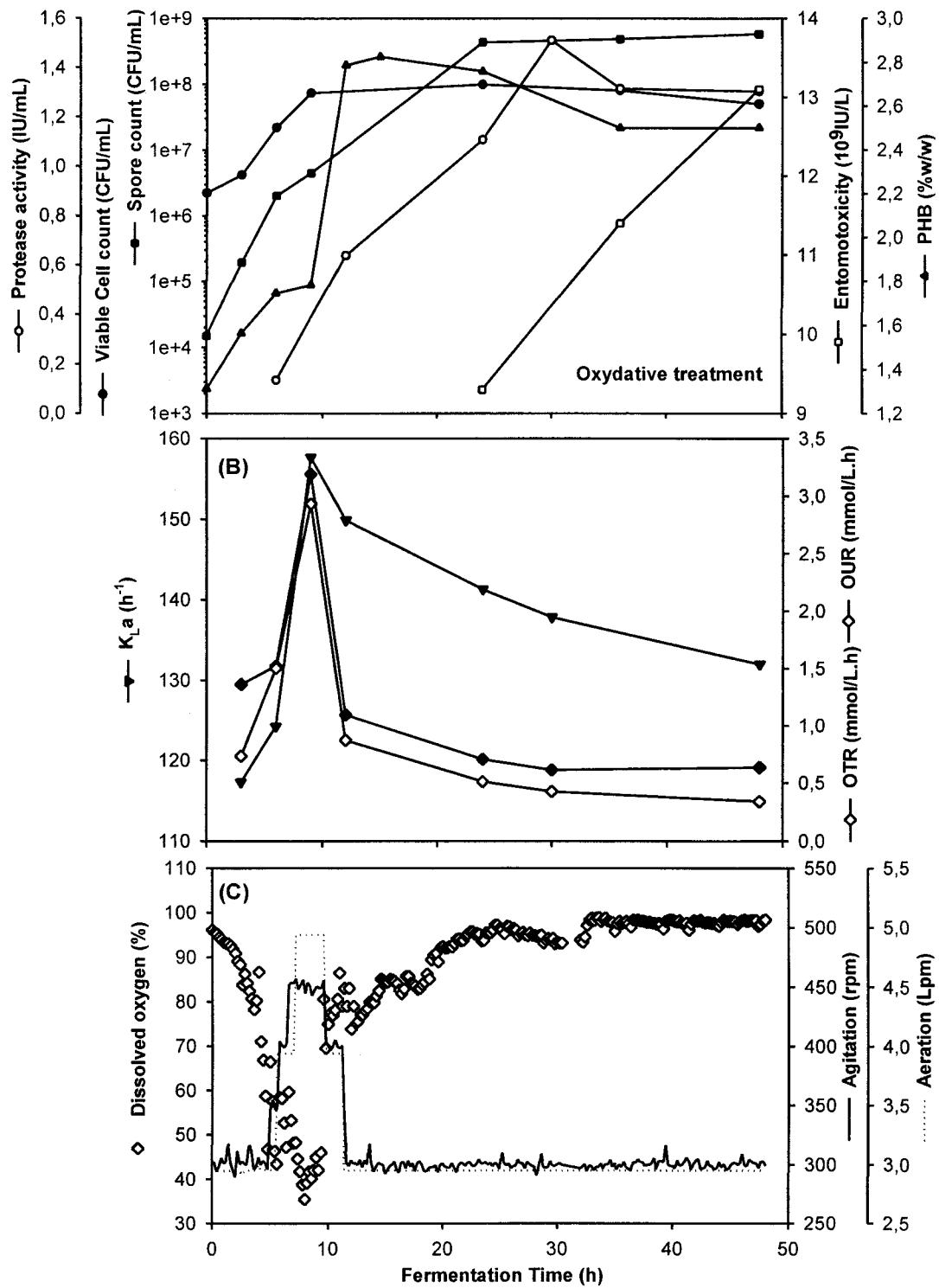
	Raw sludge	Thermo-alkaline pre-treated sludge	Oxidative pre-treated sludge
Suspended solids after treatment (g/L)	20	20	20
C/N ratio	7	5.7	6.5
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.35	0.50	0.42
K <sub>La</sub> peak (h <sup>-1</sup> )	117.2	192.9	157.6
OTR peak (mmol/l.h)	2.78	6.31	3.18
OUR peak (mmol/l.h)	2.71	5.38	2.93
Viable cell count at 48h (cfu/mL)	0.5x10 <sup>8</sup>	0.4x10 <sup>8</sup>	0.5x10 <sup>8</sup>
Spore count at 48h (cfu/mL)	5.4x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>8</sup>	5.8x10 <sup>8</sup>
Total cell count at 48h (cfu/mL)	5.9 x10 <sup>8</sup>	8.3x10 <sup>8</sup>	6.3x10 <sup>8</sup>
% sporulation	91.5	95.1	92
Max PHB (% w/w)	4.957 at 15h	1.284 at 12h	2.826 at 15h
Max protease activity (IU/mL)	2.6 at 36h	1.2 at 36h	1.5 at 30h
Entomotoxicity at 48h (10 <sup>9</sup> SBU/L)	12.3	16.6	13.1
Entomotoxicity per 10 <sup>3</sup> spores	22.7	21.0	22.5



**Figure 1.** Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and entomotoxicity potency (A) Evolution of  $K_{La}$ , OTR and OUR (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration (C) during *Bacillus thuringiensis* growth in raw sludge



**Figure 2. Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and Entomotoxicity potency (A) Evolution of K<sub>La</sub>, OTR and OUR (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration (C) during *Bacillus thuringiensis* growth in thermo-alkaline pre-treated sludge**



**Figure 3. Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and Entomotoxicity potency (A) Evolution of  $K_{La}$ , OTR and OUR (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration (C) during *Bacillus thuringiensis* growth in oxidative pre-treated sludge**



## **CHAPITRE 4 : CORRÉLATION ENTRE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE ET LE POTENTIEL ENTOMOTOXIQUE**



**Correlation Between Entomotoxicity Potency and Protease Activity Produced  
by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Grown in Wastewater Sludge**

**A.Yezza<sup>1</sup>, R.D. Tyagi<sup>1</sup>, J.R. Valéro<sup>1,2</sup>, R.Y. Surampalli<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>INRS Eau, Terre et Environnement, 490, rue de la Couronne, Québec, Canada, G1K 9A9

<sup>2</sup>Service Canadien des Forêts, Centre Foresterie des Laurentides

<sup>3</sup>US Environmental Protection Agency

***Enzyme and Microbial Technology. Submitted***



## **Correlation Between Entomotoxicity Potency and Protease Activity Produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Grown in Wastewater Sludge**

### **RÉSUMÉ**

Dans cette étude, le biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été produit à l'échelle laboratoire dans des boues à différentes concentrations de matières en suspension. Le compte de cellules et de spores ainsi que le potentiel entomotoxique augmentèrent proportionnellement avec la concentration de matières en suspension dans les boues. De même, l'activité protéolytique augmenta avec la concentration de matières en suspension dans les boues, toutefois après avoir atteint un pic vers 36h, elle se mit à baisser. Indépendamment de la concentration de matières en suspension, et jusqu'au pic, i) l'activité protéolytique augmenta de façon exponentielle avec le compte de cellules total, et ii) le potentiel entomotoxique augmenta de façon linéaire avec l'activité protéolytique. Par ailleurs, une relation exponentielle a été établie entre le potentiel entomotoxique et la concentration de spores. Toutes ces corrélations ont été testées avec un modèle de régression et sont hautement significatives.

**Mots clés:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Boues d'épuration, Protéase alcaline, Sporulation Entomotoxicité.

## **ABSTRACT**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) production using wastewater sludge as a raw material was studied in bench-scale fermentor at different sludge solids concentration. Final cell and spore counts and entomotoxicity increased with sludge solids concentration. Maximal protease activity also increased with solids concentration, however, it decreased after attaining a peak at about 36h. Irrespective of the sludge suspended solids concentration, protease activity (until its peak) showed an exponential relationship with total cell count and a linear relationship with entomotoxicity potency. An exponential correlation was also established between spore concentration and entomotoxicity. The correlations tested using a regression model were highly significant.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Wastewater Sludge, Alkaline Protease, Sporulation, Entomotoxicity

## **1. INTRODUCTION**

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* has been exclusively used as a biological control agent against many lepidopteran larvae including spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*), one of the major pests of North American coniferous forests. In addition to  $\delta$ -endotoxins and spores responsible for the insecticidal activity, *Bt* secretes large amounts of alkaline proteases (Tyagi et al., 2002; Zouari and Jaoua, 1999). Protease production is an inherent property of *Bacillus* species and these enzymes are generally known to be constitutive or partially inducible and are controlled by numerous complex mechanisms operative during the transition state between exponential growth and the stationary phase (Beg et al., 2002; Strauch and Hoch, 1993; Priest, 1977).

*Bacillus thuringiensis* synthesises different types of proteases during the post-exponential and stationary phases, required to hydrolyse complex proteins in order to satisfy its nutritional needs (Braun 2000; Chu and Li, 1992). The hydrolytic activities of *Bacillus thuringiensis* are regulated by different induction levels depending on the composition of the medium and that this bacterium is able to grow and produce efficiency the  $\delta$ -endotoxin when the medium is complex (Zouari and Jaoua, 1999; Kole et al., 1988). Proteases are involved in spore and  $\delta$ -endotoxin synthesis in two ways. Firstly, they may cleave the cellular wall of sporulating cells, thereby promoting the release of mature spore and crystal-protein into the medium (Sharipova et al., 2002; Balaban et al., 2002). Secondly, alkaline proteases can provide spores and crystals with amino acids and oligopeptides through hydrolysis of complex materials to smaller molecules for subsequent absorption by the cell (Balaban et al., 2003; Tan and Donavan, 2000; Salamitou et al., 1996).

Bt process performance using wastewater sludge as raw material is greatly influenced by sludge composition, especially carbon and nitrogen sources (Vidyarthi et al., 2002), sludge suspended solid concentrations (Lachhab et al., 2001; Sachdeva et al., 2000), and physical factors such as inoculum age, volume and physiology (Lachhab et al., 2001) and dissolved oxygen (Vidyarthi et al., 2001). This previous research work, has shown that higher entomocidal activity could be achieved by (a) a higher maximal specific growth rate (entomotoxicity exhibited a linear relationship with maximal specific growth rate); (b) a higher spore count; (c) a better spore maturation. No relationship was established between protease activity and entomotoxicity

potency. An improvement of 30% of the entomotoxicity potential was obtained at pilot scale under controlled dissolved oxygen and pH as compared to shake flask conditions. Besides, protease activity increased by 3.4 times at pilot scale compared to the maximal activity obtained in shake flask (Yezza et al., 2004a). It is clear here that the increase of oxygen transfer rate at the pilot scale increased protease activity and, consequently, final entomocidal activity. It is well known that oxygen transfer is a key variable for Bt growth, sporulation and endotoxin and alkaline proteases production (Zouari et al., 2002; Abdel-Hammed, 2001; Avignone-Rossa et al., 1992). Thus, we could speculate here that production of proteases exhibits a characteristic relationship in regard to entomotoxicity potency.

Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of sludge suspended solids concentration on process performance and to elucidate relationships between protease activity, entomotoxicity potency and total cell count produced by *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* (Btk) in wastewater sludge.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Bacillus thuringiensis* strain

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (ATCC 33679) (Bt) was used in this study. An active culture was maintained by streak inoculating nutrient agar slants plates, incubating at 30°C for 48h and then storage at 4°C for future use.

### 2.2. Inoculum preparation

The inoculum was prepared in a two-step process as reported by Lachhab et al. (2001). All the media used for inoculum preparation were adjusted to pH 7 before autoclaving. Aliquots of bacteria from the slant were used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterilized TSB (Tryptic Soy Broth, 3% v/v, Difco). After 8-12 h incubation in a rotary shaker at 30 °C and 250 rpm (revolution per minute), a 2% (v/v) inoculum of this broth was used as seed culture to inoculate 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 ml of the same medium as used in the fermentor. The flasks were then incubated in a rotary shaking incubator at 30°C and at 250

rpm for about 8-12 h. Finally, a 2% (v/v) inoculum of the actively growing cells of the pre-culture was transferred to the fermentor.

### **2.3. Fermentation medium**

Batch culture was carried out using secondary wastewater sludge from a wastewater treatment plant in Quebec, Canada (Communauté Urbaine du Québec). The chemical and physical characteristics of the wastewater sludge used are presented in Table 1. The sludge was settled by gravity settling to increase the suspended solids concentration to 15, 20 or 25g/L. The physical characteristics of the wastewater sludge in terms of total sludge solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS) and volatile suspended solids (VSS) were determined according to standard methods (APHA, 1989). The total carbon and total nitrogen in the wastewater sludge were analysed using an NA 1500-NCS analyser (Carlo Erba Instrument). Other chemical components in the sludge like ammonia nitrogen, total phosphorus and orthophosphate as PO<sub>4</sub> were determined by Technicon Analyser II (Technicon Instruments Corporation, New York). Metal concentrations (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn, Mg, and Ca) was analysed by atomic absorption spectrometer (Spectra AA-20, Varian Techtron Pty. Ltd., Australia).

### **2.4. Fermentation procedure**

Fermentation experiments were conducted in a bench scale bioreactor (15L of total capacity) equipped with accessories and automatic control systems for dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature. The computer program used (Fix 3.5, Intellution, USA) for allowed automatic set-point control and recording of all stated parameters.

Cultivation medium was added in the fermentor and polypropylene glycol (PPG, Sigma-Canada) as a 0.1% (v/v) solution was added to control foaming during sterilization. The fermentor was sterilised in situ at 121°C for 30 min. After sterilisation, the fermentor was cooled to 30°C. The fermentors was then inoculated (2%, v/v, inoculum) with actively growing cells of the pre-culture. The agitation speed (300-500 rpm) and aeration rate (0.3-0.5 vvm) were varied in order to keep the dissolved oxygen (DO) value above 30% of saturation, which ensured an oxygen

concentration above the critical level. The pH was controlled at  $7.0 \pm 0.1$  using either 4N NaOH or 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> through computer-controlled peristaltic pumps.

Samples were drawn from the fermentor at regular intervals to determine cell and spore counts, proteolytic activity and entomotoxicity (Tx).

## 2.5. Estimation of cell and spore count

To determine total cell count and spore counts the samples were serially diluted with sterile saline solution (0.85% NaCl). The appropriately diluted samples (0.1mL) were plated on TSA plates and incubated at 30°C for 24 h to obtain fully developed colonies. For the spore count, the appropriately diluted samples were heated in a silicone bath at 80°C for 10 min and, then, chilled on ice for 5 min. This heat/cold shock lysed the vegetative cells and liberated those spores already formed in the bacterial cells. The titter of cells and spores were estimated by counting colonies grown on nutrition media. For all counts, an average of at least three replicate plates was used for each tested dilution. For enumeration, 30–300 colonies were counted per plate. The results were expressed as colony forming units per mL (cfu/mL). In order to establish the reliability and reproducibility of the plate count technique, 10 independent samples were drawn (at the same time) from the shake flask experiment and were serially diluted and plated. Each dilution was plated in three different plates, the colonies were counted, and the standard deviation was calculated. The standard deviation thus calculated was 6%.

## 2.6. Bioassay

Entomotoxicity (Tx) of the samples was measured by a bioassay as the relative mortality to eastern spruce budworm larvae (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the destruction of conifer forests compared to the mortality induced by the commercial forestry formulation Foray 76B (Abbott Labs, Chicago, USA) and expressed in terms of relative spruce budworm potency unit (SBU). This commercial product contains a mixture of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* at a potency of  $20.1 \times 10^9$  IU/L (International Unit) measured against cabbage looper (*Trichoplusia ni*). Comparative bioassays were conducted on Bt fermented sludge

samples using spruce budworm larvae and cabbage looper. It was found that SBU values reported in this research were 20-25% higher than IU values.

The bioassays were carried out using the diet incorporation method (Beegle, 1990). With this technique, 1.5mL of serially decimal diluted sample was mixed with 30 mL of a molten (usually 55°C) agar based diet and distributed into 20 bioassay tubes (1mL in each tube). Three sets of controls (diet with sterilised production medium) were also included in the procedure to correct for the mortality of larvae due to the sludge or wastewater only. One third-instar larvae of Eastern spruce budworm was placed in each vial after the diet solidified. The vials were incubated at ambient temperature for one week and mortality of the larvae was estimated. Samples showing a mortality more than 10% in controls were discarded and the whole procedure was repeated. The standard deviation for entomotoxicity measurement was less than 5%.

## **2.7. Proteolytic activity assay**

Proteolytic activity was determined according to Kunitz (1947) with minor modifications. Samples collected from the fermentor were centrifuged at 8000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant thus obtained was properly diluted with borate buffer, pH 8.2. Alkaline protease activity was assayed by incubating 1mL of properly diluted enzyme solution with 5mL of casein (1.2% w/v, Sigma-Aldrich Canada inc.) during 10 minutes at 37°C in a constant temperature water bath. The reaction was terminated by adding 5mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). This mixture was incubated for 30 min to precipitate the total non-hydrolysed casein. Parallel blanks were prepared with inactivated casein. At the end of the incubation period, samples as well as blanks were filtered using Whatman paper 934-AH. The absorbance of the filtrate was measured at 275 rpm. Validation of the results was established by treating a standard enzyme solution of known activity, in the same way and under the same conditions. One international proteolytic activity unit (IU: international unit) was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmole (181µg) of tyrosine from casein per minute at pH 8.2 and 37°C. Statistical treatment of the results showed a maximal deviation of 5%.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Effect of sludge suspended solids concentration on growth, sporulation, proteolytic activity and entomotoxicity potency

In order to evaluate the effect of sludge suspended solids concentration on process performance, three concentrations were used: 15, 20 and 25g/L. Profiles for total cell and spore count; entomotoxicity and proteolytic activity obtained at these different sludge suspended solids concentrations are illustrated in Figure 1. The values for maximal specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) were  $0.387\text{h}^{-1}$ ,  $0.431\text{h}^{-1}$  and  $0.524\text{h}^{-1}$  for 15, 20 and 25g/L of sludge suspended solids, respectively (Table 2). The highest cell and spore concentrations and Tx values were observed at a suspended solids concentration of 20-25 g/L. This is in agreement with the results reported earlier (Lachhab et al., 2001; Vidyarthi et al., 2002; Sachdeva et al., 2000). These authors also observed an increase in value for  $\mu_{\max}$ , Tx, cell and spore counts with sludge solids concentration with maximal values at solids concentrations of 20–25 g/l. The nutrients required for Bt growth are embedded in sludge solids, therefore, the nutrient concentration in the production medium increased with the sludge solids concentration. As a result, cell and spore counts,  $\mu_{\max}$ , and Tx values increased with sludge solids concentration. Additionally, total cell count, spore count, and Tx value increased by almost 46%, 44% and 30%, respectively in the fermentor compared to shake flaks (Table 2). These results are also in line with our previous results (Yezza et al., 2004a,b,c,d; Tyagi et al., 2002) and, the improvements were due to better oxygen transfer and to pH control.

Protease activity increased with fermentation time and maximal activity also increased with solids concentration (Figure 1, Table 2). Maximal protease activity was attained at 36h irrespective of solids concentration. Maximal protease activity obtained at 25 and 20g/L sludge suspended solids concentration was 1.75 and 1.5 time that of the maximal activity obtained at 15g/L (Table 2). This was due to increased quantity and availability of nutrients with increasing sludge solids concentration. These results confirmed earlier reports on protease production, where it was observed that complex carbon and nitrogen sources were better substrates for protease production than simpler sugars which cause catabolite repression (Puri et al., 2002; Zouari et al., 2002; Tan and Donovan, 2000; Zouari and Jaoua, 1999).

It can be seen from Table 2 that the protease activity obtained under controlled conditions in the fermentor, for the same suspended solids concentration (25g/L) was about two times higher than under uncontrolled conditions (shake flasks) and this was due to better control of some parameters (pH and dissolved oxygen concentration). It is also well known from the literature that oxygen transfer rate and pH are the key variables for the production of alkaline proteases (Kumar and Takagi, 1999; Anwar and Saleemuddin, 1997). Meunier (1999) showed that change of pH during growth of *bacillus* sp. (protease producers) in wastewater sludge during shake flasks experiments inactivated the proteolytic enzymes. Also, it has been concluded that pH could strongly affect many enzymatic processes within the cells and the transport of various components across the cell membrane (Moon and Parulekar, 1991).

### **3.2. Role of protease production on spore maturation and entomotoxicity potency**

Irrespective of the sludge suspended solids concentration, spores were detected from the beginning of the exponential growth, increased monotonically until the beginning of stationary phase, thereafter reached near their maximum after about 24h growth and increased slowly until the end of fermentation time (Figure 1). Synthesis and secretion of the proteases were initiated during the exponential growth phase, with a substantial increase between 20 to 36h, generally speaking. Maximal protease activity was obtained at 36 h and thereafter declined (Figure 1). However, entomotoxicity potency increased linearly until the end of fermentation (48h growth). Similar patterns were also observed in our previous work (Yezza et al., 2004a,b,c,d; Tyagi et al., 2002).

The available organic matter present in sludge has been classified as easily biodegradable, biodegradable and difficult to biodegrade (Tirado-Montiel et al., 2003). In the beginning of the fermentation Bt consumed the easily biodegradable material to ensure growth, thus there was a slow increase in protease activity during the first 10-12h of fermentation. Moreover, this slow increase of protease activity at the beginning could also be due to low cell count. As shown in Figure 2, protease activity bears an exponential relationship with total cell count. This characteristic relationship with regard to cell count remained valid until the peak of protease activity (36h). As cell concentration increased, more cells in the cultivation medium synthesized more protease to hydrolyse the complex protein into amino acids resulting in an increase in protease activity.

After 24h of growth, the spore and cell counts increased very slowly, however, protease activity continued increasing substantially until 36h. Also, only 70-85% of the maximal Tx value had been obtained at 24h. Low Tx values at this time (24h) were due to the fact that although almost maximum cells were sporulated but did not mature, and crystals could not be still fully formed. The sporulative events in sporulating bacteria occurs in a series of seven distinct physiological stages accompanied by biochemical changes. These stages are: preseptation (stage I), septation (stage II), engulfment (stage III), cortex formation (stage IV), coat formation (stage V), spore maturation (stage VI) and free spore formation through lysis of the mother cell (stage VII) (Bulla et al., 1980). Moreover, Liu and Tzeng (2000) showed that the crystal protein is formed mainly during the spore engulfment and cortex formation stages of the sporulation process and is almost full size at the time that the exosporium appears (stage IV).

The increase in proteolytic activity between 20 and 36h, could be attributed to three major phenomena: **i)** Depletion of easily biodegradable organic matter. Easily biodegradable organic matter disappeared during the exponential and declining phase (0-24h) and only difficult to biodegrade (or more complex) material remained, which induced greater synthesis of protease. Consequently, protease concentration in the medium significantly increased (20 to 36h). At this time, protease production was superior to protease deactivation. **ii)** The formation of spore coats and cortex requires active synthesis of proteins (Balaban et al., 2003; Sharipova et al., 2002). This synthesis of spore coats benefited from oligopeptides and amino acids derived from proteolytic hydrolysis of complex sludge material. The free amino acid content was found to increase parallel to protease activity in Btk (Reddy and Venkateswerlu, 2002). **iii)** Crystal synthesis needed a higher protein quantity that was provided by hydrolysis of complex protein (mediated by protease) in the residual complex substrate (sludge) that led to synthesis of higher amounts of proteases. The parasporal crystal comprises approximately 20 to 30% of dry weight of the sporulated culture and usually consists mainly of protein (95%) and a small amount of carbohydrate (5%) (Yamamoto, 1982). During spore formation, *Bacillus thuringiensis* produces large amounts of various proteins that coalesce to form crystals, which are released to the extracellular environment upon lysis of the mother cell (Tan and Donovan, 2000). This parasporal crystal of Bt is observed during engulfment (stage III) which is almost full sized at the time that

the exosporium appears (Stage IV), and is a sporulation specific event (Balaban et al., 2003; Liu and Tzeng, 2000; Starzak and Bajpai, 1991).

The peak of alkaline protease at 36h (Figure 1) may also correspond to the release of intracellular proteases along with the mature spore and the full crystal. Zouari and Jaoua (1999) also observed a higher protease activity towards the end of fermentation while cultivating Bt using crude and hydrolysed gruel based medium; they suggested that this phenomenon could be due to intracellular protease release during the sporulation step. More than 90%, 81% and 76% of the cells had sporulated, respectively, at 25, 20 and 15g/L of sludge suspended solids concentration at 36h. Consequently, more than 90% of maximal entomotoxicity potency was attained at 36h, irrespective of the sludge suspended solids concentration (Figure 1).

Regardless of sludge suspended solids concentration, an abrupt decline on protease activity was noticed after the culture reached the maximal protease activity (Figure 1). Three reasons could explain the protease deactivation. Firstly, this could be due to limitation of carbon and nitrogen sources in the cultivation medium towards the end of fermentation (after 36h). It has been proposed in number of reports, which stated that protease secretion was declined, as the nutrients became limiting (Beg et al. 2002; Puri et al. 2002; Moon and Parulekar 1991). Secondly, protease deactivation due to several factors (such as autodigestion of protease and proteolytic attack by other proteases such as intracellular protease released after cell lysis) have also been suggested to be involved in cessation of enzyme synthesis (Chu et al. 1992). Finally, protease deactivation occurred and protease deactivation was superior to protease production. It is desirable to determine the exact mechanism by which this rapid deactivation of protease occurred. Further research in this direction is needed to clarify whether nutrient limitations or some other events triggered this mechanism (enzyme deactivation).

On the contrary, after 36h, Tx value continued increasing until harvest. From 36 to 48h, Tx value increased by 8, 9 and 11%, respectively, for 25, 20 and 15g/L of sludge suspended solids concentration. This enhancement could be attributed to release of the remaining spores and crystals.

### 3.3. Relationship between entomotoxicity potency and spore count

Based on the experimental data obtained in this work using CUQ secondary sludge at different sludge suspended solids concentration, regression analysis was performed using a computer program (SigmaPlot, Version 8.0, SPSS Inc.) to determine the relationship between entomotoxicity potency and spore count. Pooling of experimental data from several experiments provided a larger number of data for parameter estimation and, thus, increased confidence in the estimated values. As shown in Figure 3, entomotoxicity potency increased exponentially with spore count (a simple exponential decay equation;  $Y=a.\exp^{bX}$ ). The coefficient of determination  $R^2$ , was calculated to be 0.91 and the regression model was highly significant ( $P<0.001$ ).

In this respect, our findings supported the hypothesis of Liu and Tzeng (2000) to the effect that sporulation is still a worthy signature of the *B. thuringiensis* metabolism framework, especially in the study of crystal formation. Previous researches on the Bt process using wastewater sludge as a raw material are in line with this hypothesis (Yezza et al., 2004a,b,c,d; Tirado-Montiel et al., 2001, 2003; Vidyarthi et al., 2002, Lachhab et al., 2001).

However, the entomocidal activity of Bt is known to depend not only on spore concentration, but also on the quality and quantity of crystals produced and many virulence factors such as chitinases, phospholipases and proteases which may support the pathogenicity of vegetative cells during proliferation within the host (Luthy et al., 1985). Barnabé (2004) also observed that the crystal produced in sludge is more toxic than the crystal produced in a soy based synthetic medium. Also, when sludge was hydrolysed, the toxicity of crystal decreased in comparison to raw sludge but was still higher than that from soya based synthetic medium. Yezza et al. (2004c) also found that the Tx value per  $10^3$  spores slightly decreased in thermal-alkaline hydrolysed sludge. When sludge was fortified with glucose to increase carbon, the spore concentration increased drastically, however, Tx value did not proportionally increase (LeBlanc, 2004). Similarly, when the fermentation pH was controlled using ammonia and acetic acid the Tx value per  $10^3$  spores slightly decreased indicating less toxic crystals (Yezza et al. 2004d). Therefore, the relationship between spore concentration should not be generalised and that it changes with medium composition and cultivation conditions.

### 3.4. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity

From the results obtained in this study and previous works on Bt using wastewater sludge as a raw material, it was obvious that proteases are implied in final entomotoxicity potency. At the protease peak, about 90% of the total Tx value appeared in the medium in batch culture, irrespective of the medium used (raw sludge from different wastewater treatments, hydrolysed sludge, and soy based semi-synthetic medium) and cultivation conditions (Yezza et al. 2004 a,b,c,d). Since protease production decreased after the peak and no substantial increase of Tx value (about 10% increase) was observed between 36 and 48h, we proposed to establish a correlation between Tx value and protease activity until the peak of protease activity (0-36h). Protease peak magnitude and time depends on inoculum (physiology, age and volume), medium composition (suspended solids concentration of sludge, complexity and availability of carbon and nitrogen sources), culture mode (batch or fed batch) and fermentation parameters (pH, oxygen transfer and temperature).

Based on the experimental data obtained in this study, until the protease peak, Tx value increased linearly with protease activity (Figure 4). The coefficient of determination  $R^2$  was calculated to be 0.85 and the regression model was highly significant ( $P<0.001$ ).

According to the correlation established, monitoring protease activity during the fermentation course could be a useful tool to predict indirectly the potency of Bt and the termination of cultivation time. The fermentation could be ended after protease peak; a longer fermentation time does not substantially increase the Tx value. Moreover, this could also prevent the long exposure of crystal protein to the proteases, which could cause hydrolysis of the toxin crystal and, hence, lead to a low Tx value as stated in the literature. In fact, the crystal toxin of *Bt subsp. kurstaki* is composed primarily of the glycoprotein, which apparently could be degraded by proteases (serine and metalloprotease) to yield smaller a polypeptide fragment, which does not have insecticidal activity (Tan and Donavan 2000; Kumar and Venkateswerlu 1997).

### 3.5. Conclusion

Increasing in sludge solids concentration increased protease activity and entomotoxicity. Extracellular protease production was linked to growth, sporulation and final entomotoxicity potency of *Bacillus thuringiensis*. Correlations of protease activity with total cell count and Tx value were developed. Monitoring of extracellular protease activity could be recommended as a simple, suitable and rapid tool for indirect evaluation of the entomotoxicity in the course of fermentation.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for financial support (Grants A4984, STP235071, Senior Canada Research Chair). The views and opinions expressed in this article are strictly those of the authors.

### References

- Abdel-Hammed A. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2001, **17**: 857-861
- Anwar A, and Saleemudin M. Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technology* 1997, **64**, 175-183
- APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for Examination of Waters and Wastewaters, 17th ed. *American Public Health Association* 1989, Washington DC, USA
- Avignone-Rossa C, Arcas J, and Mignone C. *Bacillus thuringiensis*, sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1992, **8**, 301-304
- Balaban NP, Sharipova MR, Gabdrakhmanova LA, Mardanova AM, Tokmakova YS, Sokolova EA, Rudenskaya GN, and Leshchinskaya IB. Synthesis and Secretion of Proteinases by *Bacillus intermedius* in the Late Stages of Sporulation. *Microbiology* 2003, **72**, 295–299
- Balaban NP, Gabdrakhmanova LA, Sharipova MR, Mardanova AM, Sokolova EA, Rudenskaya GN, and Leshchinskaya IB. Proteinases from *Bacillus intermedius* secreted in the late stages of sporulation.. *Med. Sci. Monit.* 2002; **8**(5), 168-171

- Barnabé S. 2004 Bioconversion des boues d'épuration en biopesticides : utiliser le plein potentiel nutritif du substrat pour une meilleure valeur ajoutée (entomotoxicité). Ph.D. thesis, INRS-ETE, Quebec University, Quebec, Canada.
- Beegle CC. Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. In: Hickle L. A., Fitch W. L. (Eds.), Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*'. American Chemical Society, USA, 1990. 14-21
- Beg QK, Saxena RK, and Gupta R. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. *Process Biochem* 2002, **37**, 1103–1109
- Braun S. Bioassays of *Bacillus thuringiensis*, 1D. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses. In: Navon A., Ascher K.R.S (Eds.), Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International 2000, 2000. 49-72
- Bulla LA, Bechtel DB, Kramer YI, Shethna YI, Aronson AI, and Fitz-James PC. Ultra structure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 1980, **8**, 174-204
- Chu IM, Lee C, and Li TS. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1992, **14**, 755–761.
- Kole MM, Draper I, and Gerson DF. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1988, **41**, 197–206
- Kumar CG, and Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 1999, **17**, 561–594
- Kumar NS, and Venkateswerlu G. Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochem. Molec. Intl.* 1997, **42**, 901-908
- Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 1947, **30**, 291-310
- Lachhab K, Tyagi RD, and Valero JR. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry* 2001, **37**, 197-208
- LeBlanc ME. 2004 Effets des différentes stratégies et pré-traitements des biosolides municipaux sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, M.Sc thesis, INRS-ETE, University of Quebec, Canada

- Liu CM, and Tzeng YM. Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, **68**(1), 11-17
- Luthy P, Ebersold HR, Cordier JL, and Fischer H.M., Insecticidal metabolites of spore forming Bacilli. In Dring GF, Ellar DJ and Gould GW (Eds.), Fundamental and applied aspects of bacterial spores. Academic press, 1985. 475-485
- MENV, Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes : Critères de références et normes réglementaires. Direction du milieu rural, environnement Québec 2004, Canada, 138 pages.
- Meunier N. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Master thesis 1999, The University of Quebec, Quebec, Canada.
- Moon SH, Parulekar SJ. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* 1991, **37**, 467–83
- Priest FG. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 1977, **41**, 711–753
- Puri S, Beg QK, Gupta R. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. By Response Surface Methodology. *Current Microbiology* 2002, **44**, 286–290
- Reddy YC, Venkateswerlu G. Intracellular proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a protease-deficient Mutant Btk-q. *Current Microbiology* 2002, **45**, 405-409
- Sachdeva V, Tyagi RD, Valero JR. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology* 2000, **42**, 211-216
- Salamitou S, Marchal M, and Lereclus D. *Bacillus thuringiensis*: un pathogène facultatif. Annales de l'institut pasteur/actualité 1996, **7**, 285-296
- Sharipova MR, Balaban NP, Gabdrakhmanova LA, Shilova MA, Kadyrova YM, Rudenskaya GN, and Leshchinskaya IB. Hydrolytic Enzymes and Sporulation in *Bacillus intermedius*. *Microbiology* 2002, **71**, 420–424
- Starzak M, and Bajpai RK. A structured model for vegetative growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1991, **28/29**, 699-718
- Strauch MA, and Hoch JA. Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential phase gene expression. *Molecular Microbiology* 1993, **7**, 337–342

- Tan Y, and Donovan WP. Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of Biotechnology* 2000, **84**, 67-72
- Tirado-Montiel ML, Tyagi RD, Valero JR, and Surampalli RY. Production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material – Effect of process parameters. *Water Science and technology* 2003, **48**, 239-246
- Tirado-Montiel ML, Tyagi RD, and Valero JR. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research* 2001, **35**, 3807-3816
- Tyagi RD, Sikati Foko V, Barnabé S, Vidyarthi A, and Valéro JR. Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using wastewater as a raw material. *Water Science and Technology* 2002, **46**, 247-254
- Vidyarthi AS, Tyagi RD, Valero JR, and Surampalli, RY. Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 2002, **36**, 4850-4860
- Vidyarthi AS, Tyagi RD, and Valero JR. Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science and Technology* 2001, **44**(10): 253-260
- Yamamoto T. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *J. Gen. Microbiol.* 1982, **129**, 2595-2603
- Yezza A, Tyagi RD, Valéro JR, and Surampalli RY. Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2004a, In press
- Yezza A, Tyagi RD, Valéro JR, and Surampalli R.Y. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides by batch and fed-batch culture using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2004b, In press.
- Yezza A, Tyagi RD, Valéro JR, and Surampalli R.Y. Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004c. Submitted

Yezza A, Tyagi RD, Valéro JR, and Surampalli R.Y. Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of *Bacillus thuringiensis* using Different Raw Materials. *Canadian Journal of Microbiology* 2004d. Submitted

Zouari N, and Jaoua S. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain on gruel-based media. *Enzyme and Microbial Technology* 1999, **25**, 364-371

Zouari N, Ben Sik Ali S, and Jaoua S. Production of delta-endotoxins by *Bacillus thuringiensis* strains exhibiting various insecticidal activities towards lepidoptera and diptera in gruel and fish meal media. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, **31**, 411-418

**Table 1. Physical and chemical characteristics of the secondary wastewater sludge (CUQS)**

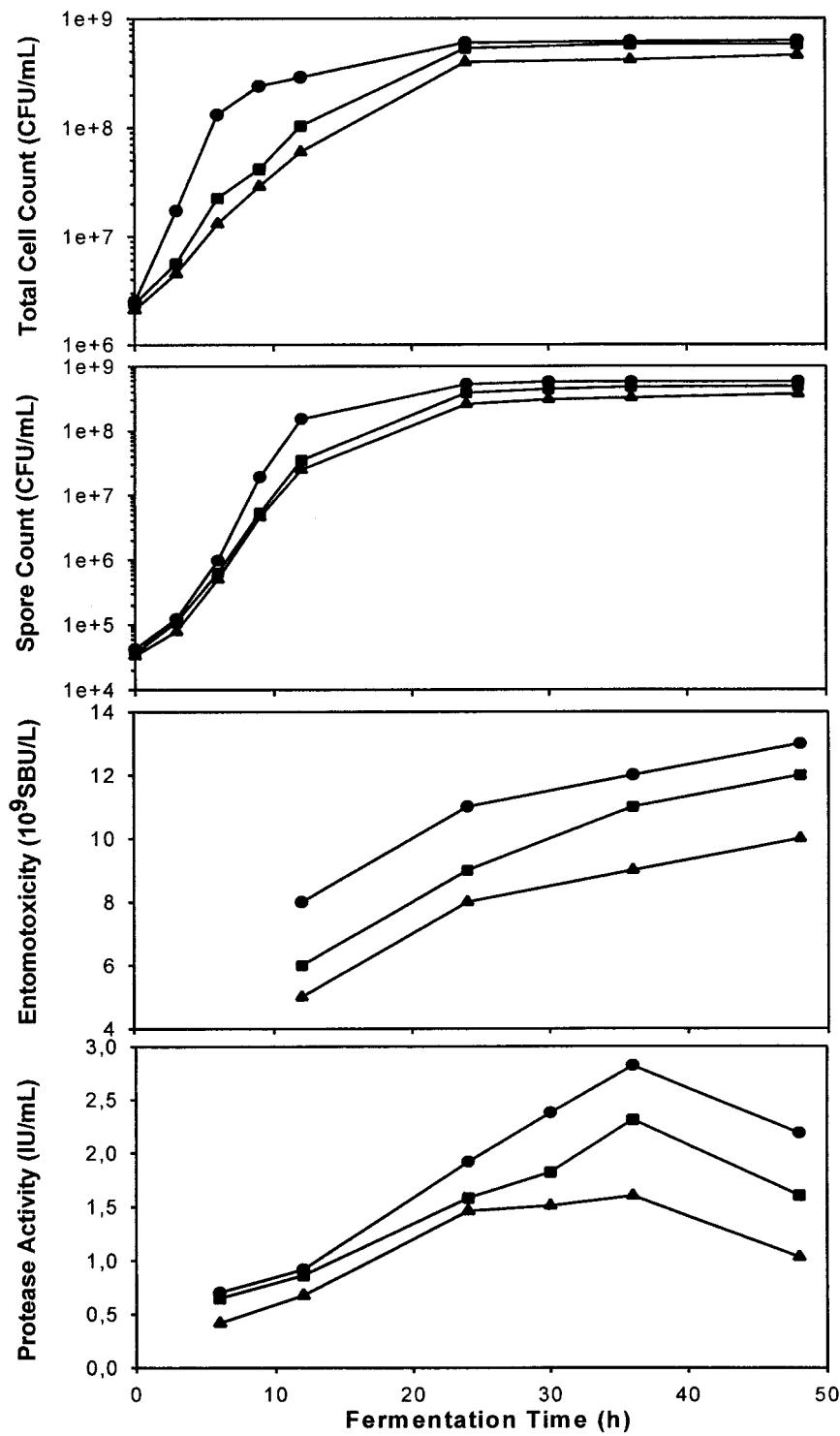
<b>Characteristics</b>	<b>CUQS</b>	<b>MENV*</b>
<i>Physical Characteristics</i>		
Total Solids (TS) (g l <sup>-1</sup> )	25	
Volatile Solids (VS) (g l <sup>-1</sup> )	11	
Suspended solids (SS) (g l <sup>-1</sup> )	15	
Volatile suspended solids (VSS) (g l <sup>-1</sup> )	10	
PH	5.5	
<i>Chemical Characteristics</i>		
Total carbon (%, dry TS)	41.0	
Total nitrogen (%, dry TS)	7.79	
Ammonical nitrogen (%, dry TS)	6.35	
Total Phosphorus (mgP/kg)	1250	
Orthophosphates (mgP/kg)	7250	
<i>Metals (in mg/kg)</i>		
Al <sup>3+</sup>	14600	
Ca <sup>2+</sup>	17200	
Cd <sup>2+</sup>	3.3	3-10
Cr <sup>2+</sup>	107	210
Cu <sup>+</sup>	250	400
Fe <sup>2+</sup>	9430	
Mg <sup>2+</sup>	1920	
Mn <sup>2+</sup>	184	
K <sup>+</sup>	2080	
Pb <sup>2+</sup>	56	150
Zn <sup>2+</sup>	458	700

\* MENV: concentrations of metals prescribed by the Quebec Environment Ministry for agriculture application (MENV 2004).

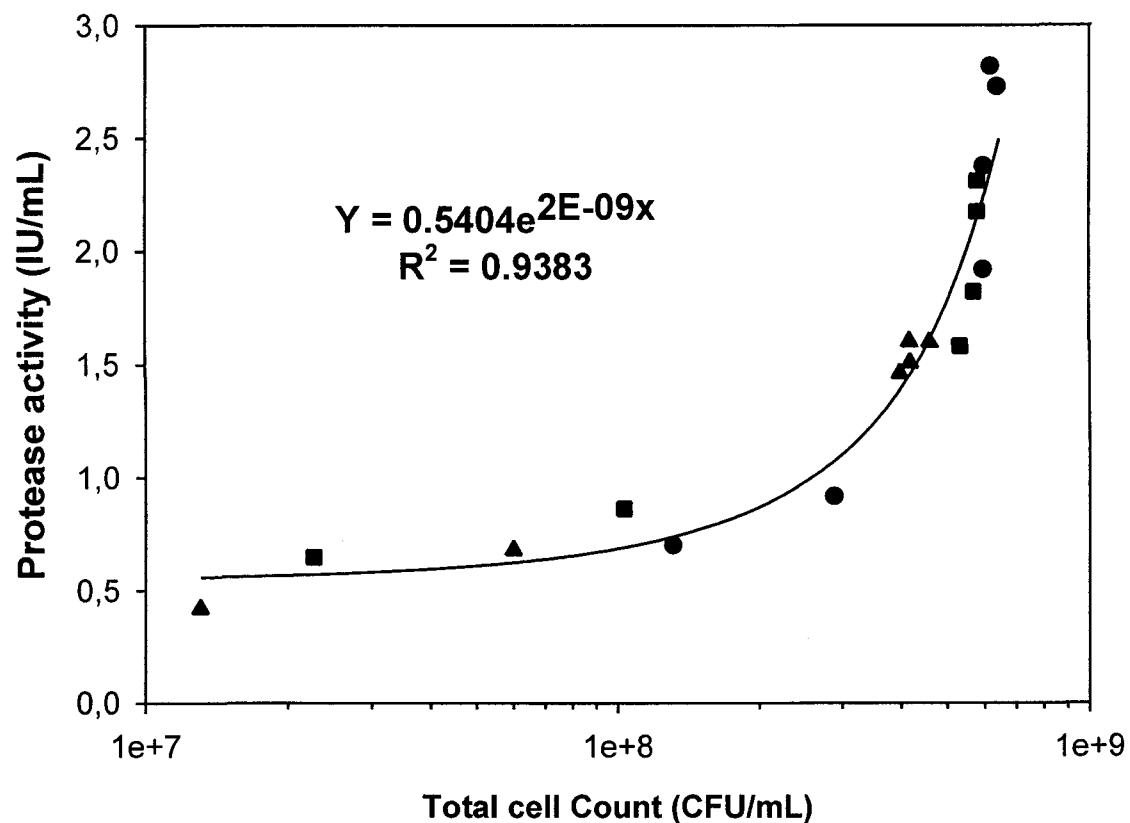
**Table 2. Performance of the Bt process in different sludge suspended solids concentration**

Sludge suspended solids	Bench scale fermentor			Shake flask *
	15g/L	20g/L	25g/L	25g/L
$\mu_{\max} (\text{h}^{-1})$	0.387	0.431	0.524	0.354
Total cell count at 48h (cfu/ml)	$4.6 \times 10^8$	$5.8 \times 10^8$	$6.37 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$
Spore count at 48h (cfu /ml)	$3.67 \times 10^8$	$4.83 \times 10^8$	$5.73 \times 10^8$	$3.97 \times 10^8$
Tx at 48h ( $10^9$ SBU/L)	10	12	13	10
Max protease activity (IU/ml)	1.6 (36h)	2.3 (36h)	2.8 (36h)	1.2 (24h)

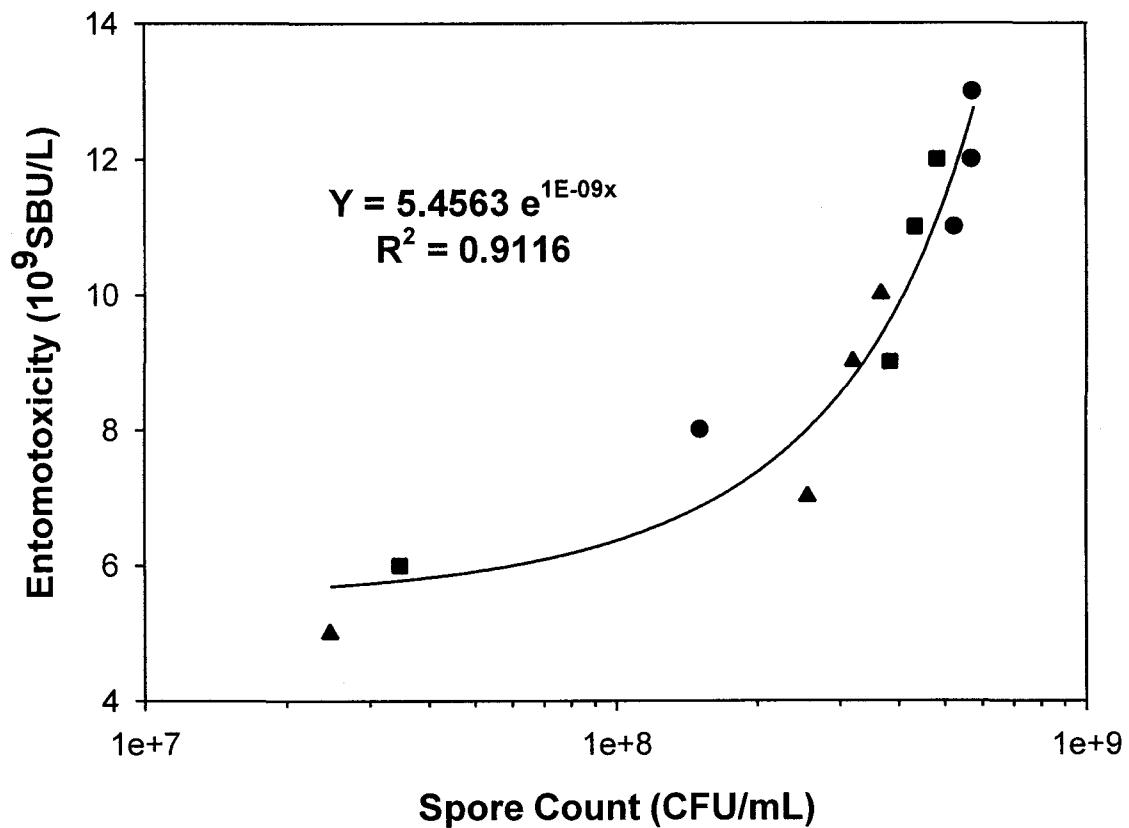
\* Data from Yezza et al (2004a).



**Figure 1. Evolution of cell and spore counts, entomotoxicity and proteolytic activity produced at different sludge suspended solids concentration ((●) 25g/L, (■) 0 g/L and (▲) 15g/L).**



**Figure 2.** Relationship between protease activity and total cell count in CUQ secondary sludge ((●) 25g/L, (■) 20 g/L and (▲) 15g/L).



**Figure 3.** Relationship between entomotoxicity potency and spore count in CUQ secondary sludge ((●) 25g/L, (■) 20 g/L and (▲) 15g/L).

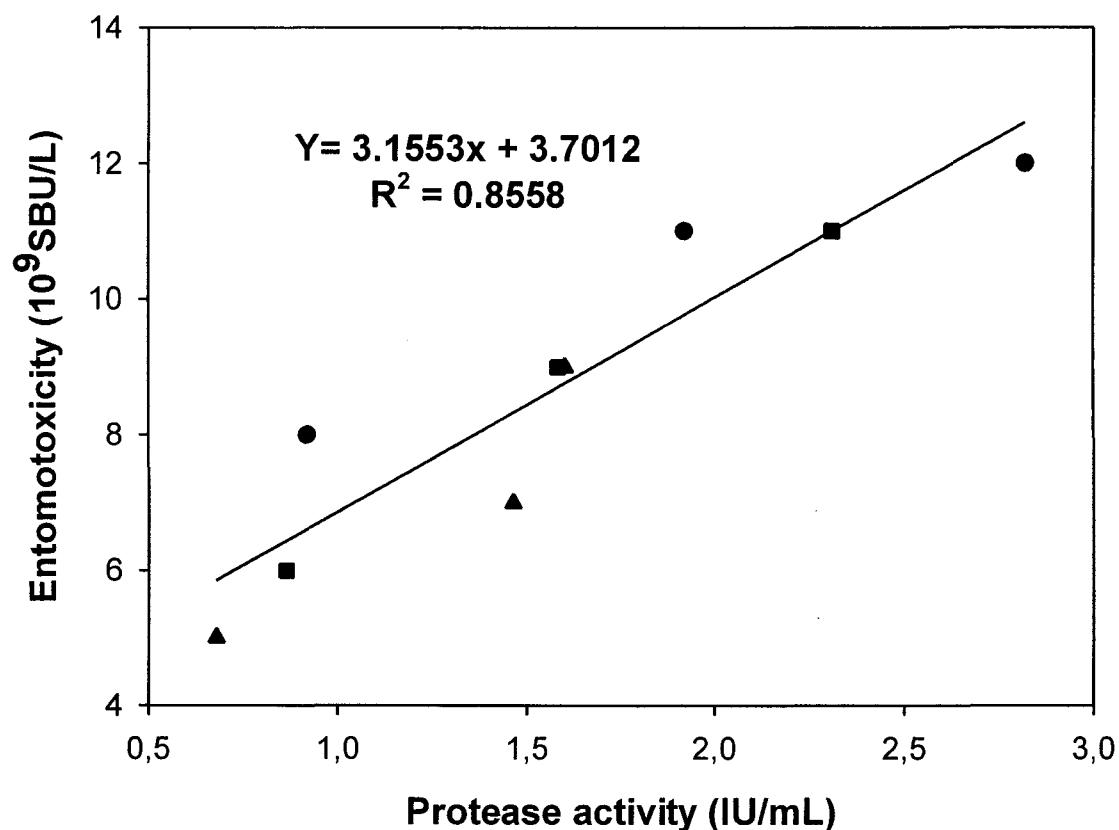


Figure 4. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity in CUQ secondary sludge ((●) 25g/L, (■) 20 g/L and (▲) 15g/L).

## **CHAPITRE V: CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS**



## **5.1 Amélioration du potentiel entomotoxique**

La présente étude confirme l'intérêt que présente les boues d'épuration des eaux usées comme milieu de culture alternatif pour la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis*. Il s'agit non seulement d'un projet de recherche appliquée sur un sujet présentant un intérêt indéniable, mais ce projet représente aussi un exemple bien concret de travaux réalisés en vue de satisfaire les exigences des critères se rapportant aux activités économiques porteuses de développement durable.

Un des facteurs pouvant déterminer le niveau des investissements pour le développement et la commercialisation de nouveaux biopesticides à base de Bt est l'obtention à l'échelle post-laboratoire, à moindres coûts, d'un produit présentant une activité insecticide supérieure en comparaison avec les produits actuellement sur le marché. Dans ce travail de recherche, nous avons démontré qu'il était possible d'augmenter de façon reproductible l'activité insecticide à partir d'un milieu composé de boues d'épuration municipales dont le coût d'approvisionnement est présentement minime. L'ensemble des stratégies développées dans cette thèse a permis d'accroître considérablement le potentiel insecticide des préparations de Bt [13 à  $18 \times 10^9$  SBU/L] et, ceci, sans concentration du bouillon de culture par des techniques physiques (centrifugation), ni formulation. Nous passons en revue ci-dessous, les améliorations apportées au procédé:

- En procédant à deux ajouts de boues fraîches durant la fermentation de Bt dans les boues d'épuration, nous avons enregistré une amélioration du compte de cellules et de spores de 1,5 fois et, subséquemment, une augmentation significative (38%) du potentiel entomotoxique, par rapport aux résultats obtenus en mode batch.
- L'addition de sources de carbone et d'azote facilement assimilables lors du contrôle de pH par l'acide acétique et l'hydroxyde d'ammonium permet d'améliorer le potentiel entomotoxique. Le potentiel entomotoxique a respectivement augmenté de 22%, 21% et 14% dans les boues de la CUQ, et de Jonquière, et dans le milieu synthétique à base de farine de soja en comparaison avec les résultats obtenus lors du contrôle conventionnel du pH avec l'hydroxyde de sodium et l'acide sulfurique.

- Il est possible de corriger les déficiences en éléments nutritifs requis pour la fermentation de *Bacillus thuringiensis* par un pré-traitement thermo-alcalin des boues. Les comptes de cellules totaux et de spores ont augmenté respectivement de 40% et 46% comparativement aux comptes enregistrés dans les boues non traitées. Le potentiel entomotoxique dans le bouillon de culture final a augmenté de 35% par rapport aux boues non traitées. Cette amélioration est attribuée d'une part à un meilleur transfert d'oxygène suite à la réduction de la viscosité du milieu de culture, et d'autre part, à une augmentation de la disponibilité des nutriments suite à la solubilisation des matières complexes contenues dans les boues.
- Le niveau de disponibilité des sources de carbone et d'azote affecte sévèrement les performances du procédé. Les eaux usées de l'industrie de transformation de l'amidon représentent un excellent milieu de culture pour la production de Bt. Les meilleurs potentiels d'entomotoxicité ont été observés avec les eaux usées amidonnées riches en amidon ( $18 \times 10^9$  SBU/L). Toutefois, les résultats obtenus lors de la fermentation des eaux usées de l'industrie d'abattage montrent qu'il ne s'agit pas d'un milieu adéquat pour la culture de Bt.

L'optimisation à l'échelle post-laboratoire est déterminante pour la réussite d'un procédé de fermentation biologique. Celle-ci doit s'effectuer dans un laps de temps acceptable, avec les ressources appropriées et déboucher sur une industrie qui respecte les impératifs de performance en matière de coût, de fiabilité et de viabilité. La mise à l'échelle pilote du procédé de fermentation de Bt dans les boues d'épuration a été réalisée avec succès et résulte en une production simultanée de nombreuses protéines toxiques et de protéases alcalines. Il est important d'indiquer que l'efficacité de la sporulation et le potentiel entomotoxique ne sont pas affectés par le changement d'échelle. On constate même une amélioration de 30% du potentiel entomotoxique à l'échelle pilote par rapport à celui obtenu en fiole. L'activité protéolytique maximale obtenue en conditions contrôlées, à l'échelle pilote, est 4 fois supérieure à celle observée en fiole. Il est généralement admis que ces augmentations sont dues à un meilleur transfert d'oxygène, un contrôle de pH et une meilleure homogénéisation du milieu de culture.

## **5.2 Évaluation du potentiel entomotoxique par les bioessais**

Certaines difficultés ont été rencontrées lors de la production de Bt, particulièrement l'établissement d'une méthode standard qui permettrait à la fois de quantifier le contenu en protéines dans le cristal et de déterminer son pouvoir toxique. La méthode d'analyse quantitative traditionnelle pour la mesure de l'activité insecticide est le compte des spores. Cependant, les récentes investigations ont montré qu'une bonne croissance et sporulation n'induisent pas forcément une forte toxicité. Dans ce travail de recherche, le potentiel insecticide des formulations de Bt a été évalué d'une manière qualitative au moyen de bioessai. Même s'il s'agit d'une technique laborieuse, elle reste néanmoins le critère de contrôle qualité le plus authentique et le plus crédible.

Le potentiel entomototoxique regroupe l'effet du complexe cristal-spore ainsi que d'autres facteurs de virulence. Cependant, il est connu que les endotoxines présentes dans le cristal constituent l'agent actif primordial. Ces toxines une fois activées par les protéases intestinales forment des pores dans la membrane lumineuse de l'épithélium, entraînant la lyse cellulaire et la désintégration de l'épithélium, permettant ainsi le contact du contenu intestinal avec l'hémolymphé et provoquant éventuellement la septicémie. C'est à ce niveau que les spores exercent essentiellement leur effet modulateur sur l'activité insecticide.

L'activité entomotoxique du bouillon de culture représente la mortalité relative des larves de tordeuse des bourgeons d'épinette (*Choristoneura fumiferana*), comparativement à la mortalité induite par une formulation commerciale (Foray 76B, Abbott Labs, Chicago, USA). Ce potentiel est exprimé en SBU (*Spruce Budworm Unit*). Cette unité de mesure a été spécifiquement utilisée pour le présent travail de recherche. Il a été constaté, en effet, que l'utilisation de IU (*International Unit*) habituellement utilisé dans la mesure du potentiel entomotoxique des formulations à base de Bt ne convenait pas dans la mesure où les résultats du standard correspondaient à la mortalité relative des larves de la fausse arpenteuse de chou (*Trichoplusia ni*). En réalisant des bioessais avec les deux larves, nous avons remarqué que les valeurs SBU reportées dans ce travail de recherche sont 20-25% plus élevées que celles exprimées en unité IU.

### **5.3 Relation entre le compte de spores et le potentiel entomotoxique**

L'observation expérimentale montre que la production de spores et celle de cristaux sont reliées. Mais jusqu'à quel point est-ce une relation pouvant être quantifiée ? Dans le cadre de notre travail de recherche, nous avons pu montrer que cette relation dépend des conditions particulières de fermentation, entre autres, du milieu de culture, du mode de culture et des paramètres de fermentation.

Au cours de la fermentation, une relation directe entre le nombre de spores et l'entomotoxicité a été établie. Nous avons pu démontrer que le potentiel entomotoxique croît exponentiellement avec le nombre de spores. En effet, l'évolution du compte de spores, montre que ce compte se stabilise ou varie légèrement après la phase de croissance exponentielle; toutefois, le potentiel entomotoxique continue à augmenter, ce qui pourrait être attribué à la maturation des spores et la synthèse des cristaux. Généralement la sporulation est accompagnée par la synthèse de δ-endotoxines. Ces derniers sont formés après la fin de la phase exponentielle, exclusivement durant la phase d'engouffrement du spore (phase III) et la formation de cortex (Phase IV).

Dans la fermentation de boues d'épuration, le potentiel entomotoxique croit avec le nombre de spore, c'est à dire que plus nous avons de spores, meilleure est le potentiel entomotoxique. En effet, la présence des spores exerce un effet synergique sur l'activité des cristaux. La capacité de germination, et donc l'invasion par les spores, est principalement responsable de cet effet synergique. Néanmoins, le compte de spores et le potentiel entomotoxique ne vont pas toujours de pair. En comparant les résultats obtenus en milieu synthétique et boues municipales, on remarque que le potentiel entomotoxique dans les boues est supérieur à celui du soja et ce, malgré un nombre de spores plus faible. En effet, la plus grande toxicité du complexe spore-cristal obtenue à partir des boues pourrait résulter en partie d'une plus grande variété de nutriments présents dans le substrat. De plus, il est vraisemblable que d'autres facteurs de virulence libérés lors de la lyse cellulaire puissent augmenter le potentiel entomotoxique du Bt produit dans les boues.

#### **5.4 Corrélation entre l'activité entomotoxique et l'activité protéolytique**

Nous avons proposé que l'activité entomotoxique accrue pouvait être attribuée à i) un taux maximal de croissance spécifique élevé, ii) un compte de spore élevé et iii) une meilleure maturation des spores. Toutefois, le rôle des protéases alcalines sur la production des spores et sur le potentiel entomotoxique, n'a pas été clairement établi.

Les protéases alcalines sont étroitement impliquées dans le processus de sporulation et de synthèse des cristaux. Ces enzymes permettent au Bt d'exploiter les différentes sources complexes de nutriments présentes dans les boues en hydrolysant la matière organique en divers acides aminés nécessaires pour la synthèse des cristaux et des spores. L'activité protéolytique augmente avec la concentration de matières en suspension dans les boues ; toutefois, après avoir atteint un pic vers 36h, elle décroît. Jusqu'au pic, nous avons montré que l'activité protéolytique croît de façon exponentielle avec le compte de cellules total. Nous avons pu montrer que l'efficacité de la formation de spore et de l'entomotoxocité est fonction de la production extracellulaire de protéases. Jusqu'au pic, le potentiel entomotoxique augmente de façon linéaire avec l'activité protéolytique. Cette relation pourrait s'avérer un outil utile et rapide pour évaluer indirectement le potentiel entomotoxique du bouillon de culture final.

Nous avons proposé d'extraire les protéases extracellulaires produites lors de la fermentation parce qu'elles sont susceptibles d'hydrolyser les protéines des cristaux et par conséquent de réduire l'activité entomotoxique lors de l'entreposage du bouillon de culture. Ceci soulève la question du rôle des protéases extracellulaires produites durant la fermentation et de celui des protéases intestinales de l'insecte que l'on croit responsables à elles seules de la solubilisation du cristal et de la libération de la protoxine dans l'intestin de la larve. En effet, lors des discussions qui ont suivi la soutenance de ce travail de recherche, le Dr Raynald Laprade (Université de Montréal) estimait que les protéases produites lors de la fermentation pourraient jouer un rôle dans l'entomotoxicité, la présence de ces protéases pouvant contribuer à la solubilisation du cristal dans l'intestin de la larve. Des travaux complémentaires ont été recommandés afin d'identifier clairement l'effet des protéases extracellulaires produites lors de la fermentation sur le potentiel entomotoxique lors de l'ingestion du produit de Bt.

## **5.5 Problèmes liés à la production de biopesticides à base de Bt dans les biosolides**

Malgré le grand intérêt pour les produits biologiques très spécifiques et peu nocifs, on constate qu'au Québec très peu de biopesticides sont actuellement offerts. Plusieurs raisons expliquent cette situation, entre autres, le manque d'infrastructures de production à grande échelle, les difficultés liées à la formulation de ces produits et à leur efficacité, le processus d'homologation laborieux et coûteux, ainsi que le manque de financement requis pour la réalisation de toutes ces étapes. Dans le cas de notre procédé, s'ajoutent l'inconstance au niveau de la composition et de la qualité des boues et la formation intensive de mousse.

Lors de la mise à échelle du procédé, l'approvisionnement en milieu de culture ne pose pas problème; les boues sont abondantes et abordables. Toutefois, un milieu de culture aussi complexe et inconstant au niveau de sa composition comme les boues d'épuration, induit des perturbations au niveau du procédé. Les performances du procédé de production de Bt dans les boues sont directement reliées à la disponibilité des sources d'azote et de carbone facilement assimilables. La qualité des boues dépend de plusieurs facteurs, dont la conformation des réseaux de collecte des eaux usées en amont de la station d'épuration, la nature des rejets des activités industrielles ou des services qu'ils desservent, les pratiques des populations, la technologie de traitement, la saison, la typologie des boues et le mode de stockage. Il a été démontré qu'en utilisant une concentration optimale de solides en suspension dans les boues (20-25 g/L), les variations de l'entomotoxicité étaient comprises entre de +9% et -13%. On a conclu que la composition des boues d'épuration n'affecte pas sérieusement les performances du procédé aussi longtemps qu'une concentration optimale en solides en suspension est utilisée.

Les boues d'épuration sont riches en diverses protéines et débris de cellules favorisant la formation de mousse. Nous avons observé que, lors de la phase de croissance exponentielle, les cellules sont très actives et demandent beaucoup d'oxygène (OUR), ce qui en conséquence nécessite un grand transfert d'oxygène (OTR) fourni par de grands taux d'agitation et d'aération. Ceci résulte en une plus importante formation de mousse. Cette mousse pourrait nuire au bon déroulement de la fermentation et provoquer la contamination et, donc, l'arrêt de la fermentation. Il apparaît qu'un contrôle adéquat de l'agitation et de l'aération permettrait de mieux contrôler la mousse et surtout éviterait l'utilisation de produits chimiques coûteux et néfastes pour la production des spores et endotoxines de Bt. De plus, lors de la conception du bioréacteur, il serait

intéressant de placer sur le même arbre d'agitation deux palettes en dehors du milieu de culture qui serviront en tant que brise-mousse permanent.

## **5.6 Réticences sociales et réglementation**

La valorisation des boues fait face à de nombreuses réticences et craintes relatives à leur composition, notamment à cause de la présence de métaux lourds, d'agents pathogènes, de l'apparence et des odeurs. Cependant, le procédé de bioconversion par lequel la culture de Bt est réalisée à partir des boues d'épuration municipales, ne présente aucun impact néfaste sur l'environnement. En effet, tous les pathogènes et les odeurs sont éliminées lors de la phase de stérilisation du milieu de culture, hormis le *Bacillus thuringiensis* qui demeure présent dans la formulation finale. De plus, il est reconnu que le Bt agit au niveau d'un grand nombre de lépidoptère tels que la tordeuse des bourgeons d'épinette, mais est en général inactif sur les insectes bénéfiques. Les propriétés toxiques du Bt ne visent que les larves de tordeuses des bourgeons de l'épinette. Quant à l'impact des métaux lourds, il est quasiment nul, étant donné les faibles quantités épandues par hectare (3L/hectare). Par ailleurs, les infimes traces de métaux toxiques sont de loin moins nocives que les milliers de litres de pesticides chimiques déversés jusqu'ici. En outre, les boues utilisées respectent les exigences en matière de protection de l'environnement et, entre autres, les règlements prévus par le Ministère de l'Environnement du Québec.

Malgré l'innocuité de ce produit pour l'environnement, le promoteur qui se lance dans la production de Bt cultivé dans des boues d'épuration devra veiller à la conformité de ce produit avec les dispositions légales en vigueur et ainsi suivre les démarches prévues par les autorités fédérales et provinciales en matière de pesticides et de fertilisants. Tout d'abord, le Bt étant destiné à la lutte antiparasitaire, il relève des textes qui régissent les pesticides. Le produit de fermentation doit obtenir un numéro d'homologation par l'Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA). D'après le *Règlement sur les permis et les certificats pour la vente et l'utilisation des pesticides* relevant de la *Loi sur les pesticides*, une fois homologué, le Bt entre dans la classe québécoise 3 des pesticides et n'est pas soumis à l'obligation de demander un Certificat d'autorisation. Toutefois, nous devons considérer que le produit relève également de la législation sur l'épandage des boues municipales en sylviculture. A ce titre, son utilisation est également soumise, en vertu de l'article 22 de la *Loi sur la qualité de l'environnement*, à

l'obtention préalable d'un certificat d'autorisation délivré par le Ministère de l'Environnement du Québec. Or l'épandage aérien de tel produit n'étant pas actuellement prévu par la réglementation, les dossiers seront donc plus vraisemblablement traités au cas par cas par les Directions régionales de l'environnement.

### **5.7 Recommandations**

Notre travail de recherche présente des avancées fort prometteuses tant du point de vue technologique que scientifique, cependant, il reste plusieurs travaux à mener afin de résoudre certaines incertitudes et surmonter les difficultés rencontrées lors des expérimentations que nous réalisées.

- Lors du contrôle du pH avec le couple NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH, nous avons obtenu de meilleure entomotoxicité par rapport au contrôle habituel par NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, toutefois, nous ne pouvons pas déterminer avec certitude, quelle est l'origine de cette amélioration. Nous proposons de réaliser une expérience avec NaOH/CH<sub>3</sub>COOH et NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> afin de bien identifier quelle est la source facilement assimilable de carbone (acide acétique) ou d'azote (hydroxyde d'ammonium) responsable de cette amélioration.
- Les boues secondaires ayant subi un pré-traitement thermo-alcalin ont offert les meilleurs potentiels entomotoxiques. Après pré-traitement, le milieu de culture subit un second choc thermique suite à la stérilisation. Il serait préférable d'exécuter le pré-traitement thermo-alcalin comme une stérilisation afin de ne pas dégrader la matière organique utile et surtout de minimiser les coûts énergétiques.
- Nous avons montré que la mise à échelle a été réalisée avec succès, de même nous avons développé trois stratégies susceptibles d'améliorer le potentiel entomotoxique. Nous proposons de réaliser une expérience à l'échelle pilote en combinant les stratégies développées dans ce travail et celles précédemment développées dans notre laboratoire de recherche.
- Des potentiels entomotoxiques fort intéressant ont été enregistrés ( $13\text{-}18 \times 10^9$  SBU/L) et ce, sans procéder à la concentration, ni à la formulation du bouillon de fermentation. La résistance des produits à base de Bt dépend de la formulation utilisée ainsi que de divers facteurs écologiques, tant physiques que biotiques. Nous recommandons de réaliser des

travaux de formulation du bouillon de culture et d'en évaluer la stabilité sous les rayonnements ultraviolets et la pluie.

- Les cristaux sont constitués d'un certain nombre de toxines différentes, qui ont une activité insecticide plus ou moins grande envers un insecte donné et dont les proportions relatives sont aussi susceptibles de changer selon les conditions de fermentation et les milieux de culture. Il serait intéressant de purifier les cristaux produits dans les boues d'épuration afin de pouvoir mesurer le contenu en endotoxines et la proportion des différentes protéines toxiques dans ces cristaux.
- Des travaux complémentaires doivent être réalisés afin d'identifier clairement l'effet des protéases extracellulaires produites lors de la fermentation sur le potentiel entomotoxique lors de l'ingestion du produit de Bt.
- Les coûts de production du produit de fermentation comme le Bt dépendent d'un grand nombre de facteurs. Il est indispensable de réaliser une étude de faisabilité économique du procédé afin d'évaluer l'impact du coût du substrat et celui des améliorations apportées par le projet sur le coût de production du biopesticide.



## **ANNEXES**



## **ANNEXE I**

**Développement d'une stratégie de production à haute densité cellulaire  
« Fed batch »**



# **Développement d'une technique de production à haute densité cellulaire (*fed-batch*) en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation**

## **1. OBJECTIFS**

Il s'agit de développer une stratégie d'alimentation appropriée (*Proper feed rate*) qui pourrait améliorer le potentiel entomotoxique sans compromettre la croissance de la bactérie. Pour ce faire divers essais d'optimisation doivent être accomplis afin de déterminer les paramètres de l'essai :

- Optimiser le volume de l'ajout;
- Déterminer le nombre d'ajout;
- Varier la composition de l'ajout ;
- Fixer les temps d'ajout;
- Durée de fermentation.

## **2. METHODOLOGIE**

Les cultures discontinues à apport contrôlé de substrat (Fed batch) ont été largement mises à profit comme le moyen de maintenir la fermentation en phase exponentielle, afin d'augmenter la masse cellulaire. Il existe deux techniques de production en mode Fed Batch :

- 1) Intermittent (Intermittent Fed Batch Culture): consiste à démarrer la fermentation avec un volume initial  $V_0$  de milieu nutritif contenant une masse cellulaire relativement élevée et suffisamment active pour permettre une croissance rapide des cellules. Grâce au milieu neuf (frais) continuellement apporté avec un profil approprié, il est possible de maintenir la croissance à son niveau optimal tout au long du processus. La culture est terminée lorsque le volume du liquide atteint le volume de travail du fermenteur.

- 2) Répété (Repeated Fed Batch Culture) : consiste à soutirer un certain volume de la culture pour le remplacer par une quantité proportionnelle en nutriments frais. Le résidu de la culture en croissance pourrait être utilisé comme inoculum pour la fermentation subséquente.

Le contrôle d'une culture à volume expansé vise principalement à maintenir une stratégie d'alimentation appropriée (*proper feed rate of substrate*) pour prévenir une inhibition par le substrat. Pour atteindre cet objectif, divers paramètres doivent être optimisés :

- 1) Volume de départ : Afin de déterminer le volume de départ, des expériences d'optimisation préliminaires en fiole ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent qu'il est intéressant de commencer en mode IFBC, c'est à dire, de ne pas remplir le réacteur à sa capacité maximale. Le meilleur résultat est obtenu pour les 2/3 du volume de travail. Toutefois, en bioréacteur 15L, il était impossible de travailler avec un tel volume, car les sondes de contrôle de pH et de DO sont hors milieu. Par conséquent, le volume de travail minimal a été fixé à 8L. Ce choix du volume de départ permet d'éviter le problème de mousse (moins de protéines et faibles taux d'agitation et d'aération) et offre un meilleur transfert d'O<sub>2</sub> lors de la phase exponentielle. Pour ce qui est du nombre et de la nature de l'ajout, ainsi que du temps de fermentation, ils seront déterminés directement en bioréacteur de 15L.
- 2) Temps des ajouts : Le but du fed-batch est d'allonger au maximum la phase de croissance exponentielle afin de maximiser le nombre de cellules. Donc, le premier ajout se fera éventuellement vers la fin de cette phase située entre la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> heure. Les variations de l'oxygène dissout (DO) au cours de la fermentation peuvent nous fournir exactement la fin de cette phase. En effet, après inoculation, DO diminue drastiquement à cause de la croissance cellulaire, puis vers la fin de la phase de croissance exponentielle, on assiste à une augmentation abrupte du DO. Les adjonctions ultérieures seront effectuées à intervalle de 12h. La culture devrait être interrompue lorsque la production diminue, suite à la lyse cellulaire. Les nombres d'ajouts varieront entre 2 et 4 durant 72 à 96 heures de fermentation.

3) L'apport en nourriture : L'adjonction de nouveau substrat peut se faire selon l'une des options suivantes :

- L'ajout est le même que le milieu de culture ;
- L'ajout d'un milieu autre que le substrat de culture.

À partir des résultats obtenus en mode batch et en se basant sur les paramètres discutés ci-dessus, diverses stratégies d'alimentation sont proposées. Il faut noter que, toutes les fermentations seront réalisées en bioréacteur de 15L avec un volume de travail de 10L à une température de fermentation de 30°C et un contrôle de pH par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6N)/NaOH (4N). On débute la fermentation avec une agitation de 300 rpm et une aération de 3 Lpm puis on augmente celles-ci graduellement en fonction des phases de croissance.

#### Stratégie d'alimentation #1 : Technique RFBC avec 5 ajouts de 5L

Il s'agit d'opérer en mode RFBC. Cette stratégie consiste à :

- Remplir le bioréacteur avec 10 litres de boues secondaires de la CUQ à 25g/L
- Stériliser, puis laisser refroidir et inoculer (2%v/v);
- Vers la fin de la phase exponentielle (10-12h), on soutire 5L, qu'on remplace par du substrat frais (boues secondaires de la CUQ à 25g/L);
- On répète la même manœuvre à la 24<sup>ème</sup>, 36<sup>ème</sup>, 48<sup>ème</sup> et 60<sup>ème</sup> heure;
- La durée de fermentation est de 96 heures.

#### Stratégie d'alimentation #2 : Technique RFBC avec 2 ajouts de 3L

On procède comme pour la première stratégie mais en réduisant le volume du soutirage à 3L et en limitant le nombre d'ajouts à 2 (12<sup>ème</sup> et 24<sup>ème</sup> heure).

#### Stratégie d'alimentation #3 : Combinaison IFBC puis RFBC (2 ajouts, boues secondaires CUQ)

Il s'agit de combiner les deux techniques de production en mode fed batch. Avant le premier ajout le système est en mode IFBC, puis les autres ajouts se feront suivant la technique RFBC.

Cette stratégie consiste à :

1. Remplir le bioréacteur à un certain volume V<sub>0</sub> de boues secondaires de la CUQ à 25g/L (8 litres) avec un inoculum de 2% (v/v);

2. Vers la fin de la phase exponentielle (vers la 12<sup>ème</sup>heure), on complète le réacteur à son volume de travail maximal (10L) avec le même milieu de culture (boues secondaires CUQ, 25g/L);
3. À la 24<sup>ème</sup> heure, on soutire 3 litres et on complète par un nouveau substrat, toujours identique au milieu de culture (boues secondaires CUQ, 25g/L)
4. On laisse fermenter pendant 72 heures.

Stratégie d'alimentation #4 : Combinaison IFBC puis RFBC (4 ajouts, boues secondaires CUQ)

La procédure est la même que pour la stratégie #3 mais cette fois on effectue 4 ajouts à la 12<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup>, 36<sup>ème</sup> et 48<sup>ème</sup> heure. Laisser fermenter pendant 72 heures.

Stratégie d'alimentation #5 : Combinaison IFBC puis RFBC (6 ajouts, boues secondaires)

La procédure est la même que pour la stratégie #3 mais cette fois on effectue 4 ajouts à la 12<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup>, 36<sup>ème</sup>, 48<sup>ème</sup>, 60<sup>ème</sup>, 72<sup>ème</sup> heure. Laisser fermenter pendant 96 heures.

Stratégie d'alimentation #6 : Combinaison IFBC puis RFBC (2 ajouts d'eaux usées amidonnées)

On applique la même méthode que pour la stratégie #3 mais en remplaçant l'ajout de boues par l'ajout d'eaux usées amidonnées. Laisser fermenter pendant 48 heures.

Stratégie d'alimentation #7: Combinaison IFBC puis RFBC (2 ajouts, boues secondaires CUQ hydrolysées)

On procède comme la stratégie #3, mais en utilisant des boues hydrolysées comme milieu de culture et comme ajouts. L'hydrolyse des boues est réalisée suivant Barnabé (2004), la seule différence étant que le traitement thermique est réalisé dans un hydrolyseur par injection de vapeur au lieu d'un micro-onde. Laisser fermenter pendant 48 heures.

Le Tableau 1 récapitule l'ensemble des stratégies qui ont été testées afin d'identifier la meilleure technique de production.

**Tableau 1 : Stratégies de culture de Bt en mode fed-batch**

Stratégie	Technique	Substrat	Ajout	V <sub>0</sub>	N <sub>f</sub>	T <sub>f</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>n</sub>	T
#1	RFBC	CUQS	CUQS	10	5	12, 24, 36, 48, 60	5	5	96
#2	RFBC	CUQS	CUQS	10	2	12,24	3	3	72
#3	IFBC + RFBC	CUQS	CUQS	8	2	12,24	2	3	72
#4	IFBC + RFBC	CUQS	CUQS	8	4	12,24, 36, 48	2	3	72
#5	IFBC + RFBC	CUQS	CUQS	8	6	12, 2436, 48, 60, 72	2	3	96
#6	IFBC + RFBC	CUQS	SWW	8	2	12, 24	2	3	48
#7	IFBC + RFBC	CUQSH	CUQSH	8	2	12,24	2	3	48

T : temps de fermentation en heures ; V<sub>0</sub> : volume de départ en litres ; V<sub>1</sub> : volume du premier ajout en litres, V<sub>n</sub> : volume des ajouts ultérieurs en litres ; N<sub>f</sub> : nombre des ajouts ; T<sub>f</sub> : temps des ajouts (heure) ; CUQS : boues secondaires de la CUQ à 25g/L de solides ; CUQH : boues secondaires hydrolysées de la CUQ; SWW : eaux usées amidonnées.

### **3. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Les performances du procédé de production de Bt en mode batch à diverses stratégies fed batch, sont illustrées au Tableau 2. Il est à signaler que nous ne disposons pas de résultats pour les stratégies 1 et 2 et ce, du fait de l'arrêt des expériences en raison d'un arrêt de croissance suite à la manipulation des ajouts. En effet, nous avons enregistré une réduction du pourcentage de sporulation suite à une inhibition par le substrat (surnutrition). L'ajout de fortes concentrations en nutriments (5L, voir même 3 litres de substrat frais) pourrait affecter les cellules, qui deviennent surchargées. C'est à dire que la capacité oxydante des cellules est dépassée, et à cause de l'effet GRABTREE, il se forme d'autres produits qui réduisent l'efficacité du flux de carbone et qui finalement abaisse le pourcentage de sporulation. Cette réduction pourrait être due aussi à une importante différence de pression osmotique dans le milieu de culture suite à l'ajout de substrat frais. C'est pour cette raison que nous avons choisi de débuter l'expérience en mode IFBC, puis après le premier ajout, de procéder en mode RFBC.

**Tableau 2 : Performance du procédé de production de Bt pour les différentes stratégies d'alimentation**

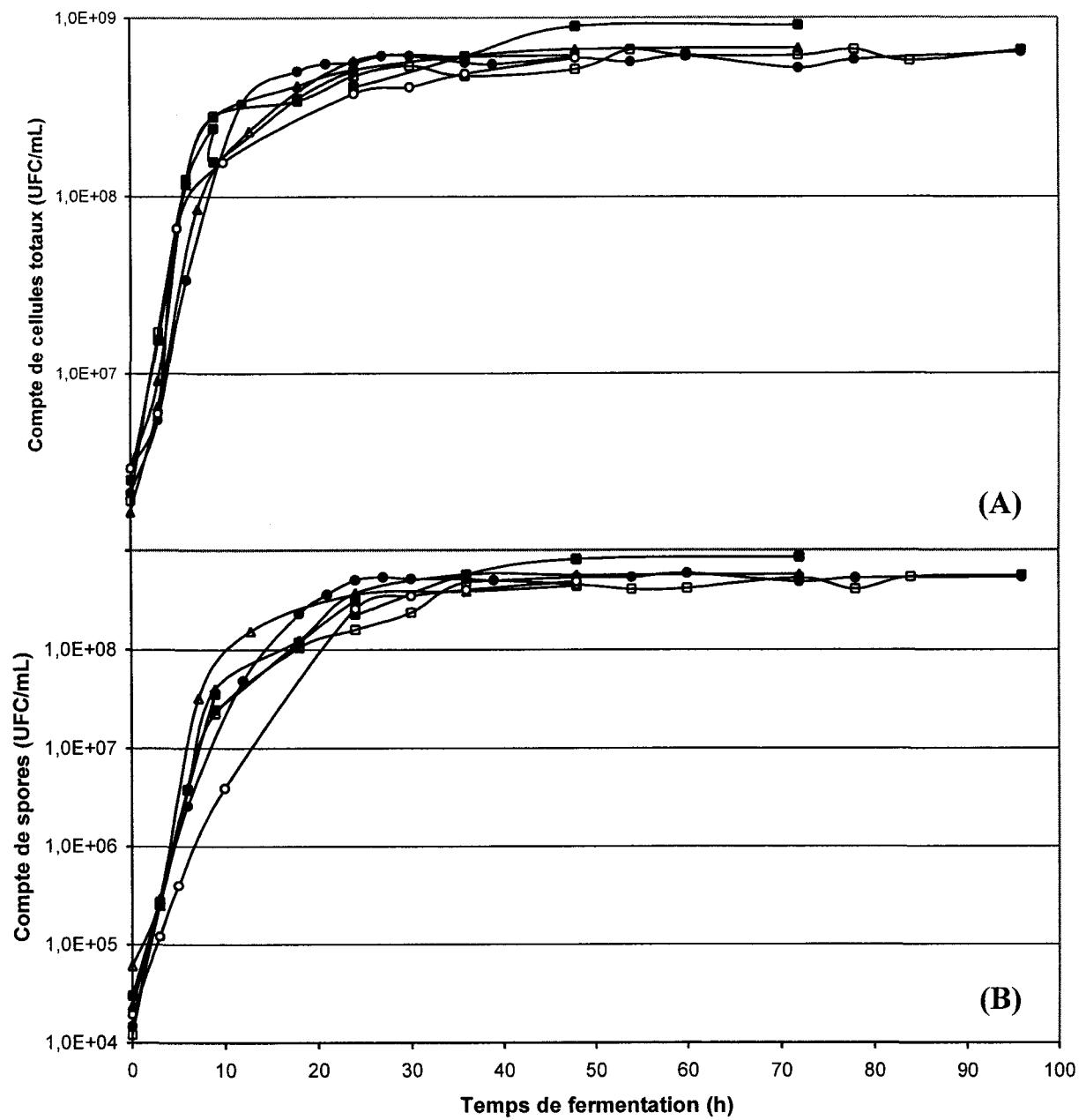
Mode of cultivation	Feeding strategies	cell count ( $10^8$ cfu/mL)	Spore count ( $10^8$ cfu/mL)	Max. Protease activity (IU/mL)	Max. Entomotoxicity (SBU/ $\mu$ L)
Batch		$5.23 \pm 0.31$	$4.83 \pm 0.29$	$2.3 \pm 0.11$ at 36h	$13078 \pm 654$ at 72h
Fed batch	#3	$9.07 \pm 0.54$	$8.60 \pm 0.51$	$1.49 \pm 0.07$ at 24h	$17975 \pm 899$ at 72h
	#4	$6.77 \pm 0.40$	$5.73 \pm 0.34$	$1.5 \pm 0.07$ at 30h	$17720 \pm 886$ at 72h
	#5	$6.17 \pm 0.37$	$5.25 \pm 0.31$	$1.42 \pm 0.08$ at 24h	$17885 \pm 894$ at 72h
	#6	$6.17 \pm 0.30$	$4.4 \pm 0.26$	$0.6 \pm 0.02$ at 15h	$12\,100 \pm 605$ at 48h
	#7	$5.97 \pm 0.35$	$4.87 \pm 0.29$	$0.9 \pm 0.04$ at 48h	$15\,843 \pm 792$ at 48h

L'évolution des comptes totaux de cellules et de spores, ainsi que celles de l'activité protéolytique et du potentiel entomotoxique sont illustrées dans les Figures 1 et 2.

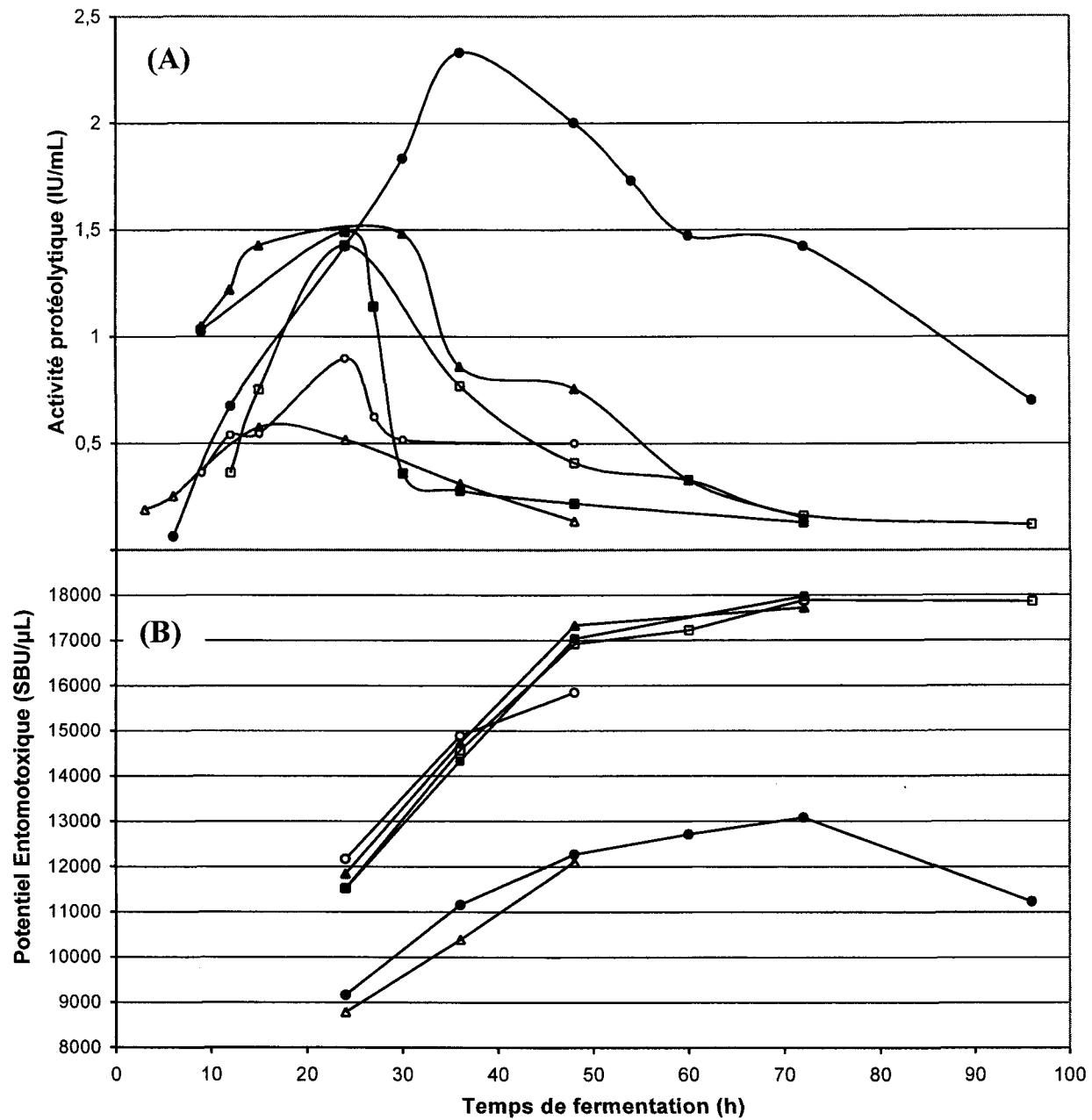
### **3.1. Évolution du potentiel entomotoxique en fonction du temps**

Contrairement aux expériences précédentes en mode batch, nous avons étalé la fermentation jusqu'à 96h au lieu de 48h afin d'identifier le pic de l'entomotoxicité. D'après la Figure 1, le compte de spores atteint son maximum après 24 h de culture et demeure presque constant tout le reste de la fermentation. Quant à l'évolution de l'activité protéolytique (Figure 2), la synthèse des protéases augmente en fonction du temps jusqu'à atteindre un maximum vers 36h puis elle décroît.

L'entomotoxicité augmente linéairement avec le temps, jusqu'à atteindre un plateau vers 72h, après lequel elle rechute (Figure 2). Le potentiel entomotoxique augmente par 6% entre 48 et 72h de fermentation, ce qui présente un très faible accroissement. De plus, entre 72 et 96h de fermentation il diminue de 15%. Donc, il serait préférable d'arrêter la fermentation après 48h de culture afin de réduire les coûts liés à la fermentation et surtout empêcher un long contact des cristaux protéiques qui peuvent être hydrolysées par les protéases alcalines libérées dans le milieu de culture.



**Figure 1.** Évolution du compte de cellules (A) et de spores (B) en fonction du temps de fermentation en mode batch et pour les différentes stratégies fed-batch développées. Batch (●) ; Stratégie#3 (■) ; Stratégie#4 (▲) ; Stratégie#5 (□) ; Stratégie#6(△) ; Stratégie#7 (○).



**Figure 2.** Évolution de l'activité protéolytique (A) et du potentiel entomotoxique (B) en fonction du temps de fermentation en mode batch et pour les différentes stratégies fed-batch développées. Batch (●) ; Stratégie#3 (■) ; Stratégie#4 (▲) ; Stratégie#5 (□) ; Stratégie#6(△) ; Stratégie#7 (○).

### **3.2. Effet du nombre d'ajouts sur la croissance, la sporulation, l'activité protéolytique et du potentiel entomotoxique.**

Après 72h de fermentation, un maximum de cellules et de spores est atteint pour la stratégie 2 (tableau 2). Le compte de cellules et de spores a atteint respectivement  $9,07 \times 10^8$  et  $8,6 \times 10^8$ . Toutefois, pour 4 et 6 ajouts nous avons des comptes un peu moins élevé.

Il est à noter aussi que jusqu'à 48h, nous avons quasiment les mêmes entomotoxicité (Figure 2) après ceci, le potentiel plafonne même si on procède à d'autres ajouts. Nous avons obtenu une amélioration significative du potentiel entomotoxique (36 à 38%). Des discussions plus approfondies ont été étalées dans le chapitre 3, Partie I.

### **3.3. Effet de la nature de l'ajout sur la croissance, la sporulation, l'activité protéolytique et du potentiel entomotoxique.**

L'ajout d'eaux usées amidonnées ne semble pas améliorer le rendement du système comparé à la stratégie 2. De même que l'ajout de boues hydrolysées n'offre pas les performances escomptées. Ceci pourrait s'expliquer par la perte de nutriment suite aux deux traitements thermiques (hydrolyse + stérilisation). Par conséquent, l'apport en nutriment de l'ajout n'est pas assez suffisant pour offrir de meilleurs potentiels entomotoxiques.

## **4. CONCLUSION**

En conclusion, nous avons optés pour la stratégie 2, en l'occurrence, réaliser la fermentation avec deux ajouts distincts de même nature de substrat (12 et 24h). Cette stratégie a fait l'objet d'une publication. Toutefois, nous proposons d'arrêter l'expérience après 48h de fermentation. Cette stratégie permettrait de réduire considérablement les coûts du procédé tout en améliorant le rendement du système.



## **ANNEXE II**

### **Raw Data**

**Scale-up of biopesticide production process using wastewater sludge as a raw material**



**Figure 1. Evolution of viable cell and spore counts, entomotoxicity and protease activity during fermentation in shake flask**

Time (h)	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)
0	1,35E+06	2,80E+04
6	5,47E+06	2,87E+05
9	2,95E+07	3,55E+06
12	1,15E+08	2,47E+07
24	2,78E+08	1,32E+08
30	3,35E+08	2,12E+08
36	4,12E+08	3,37E+08
48	4,30E+08	3,97E+08

Time (h)	Protease (IU/mL)
6	0,06
12	0,45
24	1,20
30	0,41
36	0,28
48	0,25

Time (h)	TX ( $10^9$ SBU/L)
12	5
24	7
36	9
48	10

**Figure 2. (A) Evolution of viable cell and spore counts, entomotoxicity and protease activity during fermentation. (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed,  $K_{La}$ , OTR and OUR in a bench scale fermentor (10L of working volume)**

Time (h)	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	
0	2,10E+06	1,47E+04	
3	5,47E+06	2,47E+05	
6	3,37E+07	2,57E+06	
9	3,23E+08	2,47E+07	
12	3,30E+08	4,80E+07	
15	6,13E+08	2,10E+08	
18	5,03E+08	2,30E+08	
21	5,53E+08	3,60E+08	
24	5,60E+08	5,40E+08	
27	6,13E+08	5,83E+08	
30	6,13E+08	5,17E+08	
36	5,63E+08	5,17E+08	
39	5,50E+08	5,00E+08	
48	5,97E+08	5,37E+08	
Time (h)	Protease (IU/mL)		
6	0,06		
12	0,67		
24	1,28		
30	1,83		
36	2,59		
48	2,17		
Time (h)	Tx ( $10^9$ SBU/L)		
12	6		
24	9		
36	11		
48	12		
Time (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)
3	81,29	0,74	0,56
6	112,50	1,64	1,57
9	102,86	0,76	0,49
12	102,86	0,65	0,45
15	102,86	0,59	0,38
18	100,00	0,52	0,34
30	110,00	0,55	0,34
36	109,60	0,52	0,37
45	109,80	0,44	0,32

**Figure 3. (A) Evolution of viable cell and spore counts, entomotoxicity and protease activity during fermentation. (B) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed,  $K_{La}$ , OTR and OUR in a pilot scale fermentor (100L of working volume)**

Time (h)	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	
0	2,97E+06	3,00E+04	
3	1,07E+07	1,53E+05	
6	1,60E+08	1,63E+06	
9	3,50E+08	2,63E+07	
12	3,90E+08	1,41E+08	
15	5,43E+08	2,80E+08	
18	5,13E+08	3,13E+08	
21	5,80E+08	3,77E+08	
24	6,27E+08	4,77E+08	
27	5,63E+08	4,93E+08	
30	6,13E+08	4,43E+08	
36	6,00E+08	4,80E+08	
39	6,27E+08	4,60E+08	
48	6,67E+08	5,53E+08	
Time (h)	Protease (IU/mL)		
6	0,49		
12	1,75		
24	2,97		
30	4,10		
36	2,78		
48	2,14		
Time (h)	Tx ( $10^9$ SBU/L)		
12	9		
24	10		
36	12		
48	13		
Time (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)
3	120,00	0,31	1,61
6	241,13	3,96	3,97
12	221,13	1,91	0,84
15	228,00	0,89	0,65
18	223,50	0,78	0,52
30	228,18	0,63	0,19
36	221,12	0,51	0,15
45	181,68	0,52	0,28



## **ANNEXE III**

### **Raw Data**

**Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot plant fermentor**



**Figure1. Growth of *Bt var. kurstaki* in six different media during 48h of fermentation time**

Total Cell count (cfu/mL)						
JQS	Soybean	CUQS	SWW	SHWW	BLS	
0	9,40E+05	1,30E+07	2,97E+06	1,70E+06	2,03E+06	1,47E+06
3	5,60E+06	1,67E+07	1,07E+07	8,00E+06	2,90E+06	2,80E+06
6	2,67E+07	1,73E+08	1,60E+08	1,70E+07	3,07E+06	1,41E+07
9	5,70E+07	2,33E+08	3,50E+08	7,33E+07	7,00E+06	3,31E+07
12	1,23E+08	3,17E+08	3,90E+08	3,00E+08	1,47E+07	6,37E+07
15	1,83E+08	3,30E+08	5,43E+08	3,33E+08	2,63E+07	1,60E+08
18	2,20E+08	3,23E+08	5,13E+08	3,57E+08	3,33E+07	2,63E+08
21	3,63E+08	3,57E+08	5,80E+08	5,13E+08	6,00E+07	3,53E+08
24	4,23E+08	3,43E+08	7,27E+08	8,13E+08	1,20E+08	4,83E+08
27	4,17E+08	3,00E+08	5,63E+08	8,43E+08	2,63E+08	5,27E+08
30	3,60E+08	2,73E+08	6,13E+08	1,00E+09	2,57E+08	6,83E+08
33	3,30E+08	2,93E+08	6,47E+08	1,09E+09	2,50E+08	7,03E+08
36	3,70E+08	3,87E+08	5,00E+08	1,20E+09	2,87E+08	5,30E+08
45	3,70E+08	4,43E+08	5,50E+08	1,57E+09	2,73E+08	5,30E+08
48	5,70E+08	4,90E+08	6,67E+08	1,67E+09	2,93E+08	5,83E+08

**Figure 2. Variation of the spore count of Bt var. kurstaki in six different media during 48h of fermentation time**

Time (h)	Spore count (cfu/mL)					
	JQS	Soybean	CUQS	SWW	SHWW	BLS
0	4,83E+05	9,00E+04	3,00E+04	9,00E+03	1,18E+06	1,37E+04
3	1,04E+06	8,33E+05	1,53E+05	1,53E+04	1,22E+06	1,07E+05
6	1,73E+06	2,60E+06	1,63E+06	1,03E+05	1,30E+06	1,03E+06
9	6,00E+06	2,43E+07	2,63E+07	1,87E+06	2,17E+06	2,87E+06
12	3,87E+07	1,77E+08	1,41E+08	1,23E+07	2,43E+06	1,63E+07
15	6,17E+07	2,50E+08	2,80E+08	4,27E+07	2,83E+06	3,93E+07
18	1,38E+08	2,73E+08	3,13E+08	1,23E+08	2,97E+06	1,25E+08
21	1,89E+08	2,37E+08	3,77E+08	2,97E+08	1,77E+07	2,20E+08
24	2,53E+08	2,73E+08	4,77E+08	5,63E+08	5,53E+07	4,00E+08
27	2,80E+08	2,80E+08	4,93E+08	6,03E+08	7,53E+07	5,07E+08
30	2,90E+08	2,33E+08	4,43E+08	5,80E+08	7,23E+07	5,97E+08
33	2,40E+08	2,70E+08	4,93E+08	5,80E+08	6,77E+07	5,67E+08
36	2,17E+08	3,23E+08	4,80E+08	5,73E+08	6,17E+07	5,10E+08
45	2,70E+08	3,83E+08	4,50E+08	5,93E+08	6,13E+07	5,23E+08
48	3,80E+08	4,17E+08	5,53E+08	6,60E+08	6,47E+07	5,47E+08

**Figure 3. Evolution of protease activity during the fermentation in six different cultivation media**

Time (h)	Soya	Time (h)	SWW	Time (h)	BLS
0	0,1	3	0,2	12	0,20
3	0,3	6	0,3	15	1,05
6	0,6	9	0,4	18	1,25
9	1,0	12	1,9	21	1,52
12	1,3	15	2,2	24	2,26
15	1,5	21	1,9	30	2,19
18	1,3	24	1,5	33	1,89
21	0,9	27	1,0	36	1,82
24	0,8	30	1,0	45	1,49
30	1,0	33	1,0	48	1,54
33	1,1	39	0,9	Time (h)	CUQS
36	1,1	42	0,8	6	0,5
39	1,2	45	0,9	9	1,7
42	1,2	48	0,8	15	1,7
45	1,2	Time (h)	SHWW	18	1,9
48	1,2	3	0,1	24	3,0
Time (h)	JQS	6	0,2	27	3,8
9	0,9	9	1,2	30	4,1
21	1,3	12	1,0	36	2,8
24	1,4	15	0,9	39	2,6
27	1,6	24	0,5	42	2,7
33	2,2	36	0,1	45	3,0
39	2,3	48	0,1	48	2,1
42	2,5				
45	2,4				
48	1,5				



## **ANNEXE IV**

### **Raw Data**

**Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by batch and fed-batch culture using sewage sludge as a raw material**



**Figure 1: Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration,  $K_{La}$ , OTR and OUR during fed-batch culture**

<b>Batch</b>			
<b>Time (h)</b>	<b><math>K_{La} (h^{-1})</math></b>	<b>OTR (mmol/l.h)</b>	<b>OUR (mmol/l.h)</b>
3	81,29	0,74	0,56
6	112,50	1,64	1,57
9	117,27	2,79	2,72
12	110,00	0,65	0,45
24	109,80	0,52	0,34
30	109,60	0,55	0,34
48	102,86	0,52	0,37
72	100,00	0,44	0,32

<b>Fed batch</b>			
<b>Time (h)</b>	<b><math>K_{La} (h^{-1})</math></b>	<b>OTR (mmol/l.h)</b>	<b>OUR (mmol/l.h)</b>
3	90,00	0,79	0,56
6	148,30	2,79	2,72
9	189,11	4,22	3,66
12	172,86	2,16	1,94
24	128,57	1,25	0,94
30	198,73	5,06	4,68
48	147,77	1,24	0,41
72	117,27	1,39	0,34

**Figure 2. Cell and spore counts, protease activity and entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in batch and fed-batch culture using secondary wastewater sludge (SS= 25g/L)**

Batch			Fed batch		
Time (h)	Cell count	Spore count (cfu/mL)	Time (h)	Cell count	Spore count (cfu/mL)
0	2,30E+06	2,77E+04	0	2,50E+06	3,03E+04
3	5,47E+06	2,47E+05	3	1,54E+07	2,70E+05
6	3,37E+07	2,57E+06	6	1,15E+08	3,70E+06
9	2,14E+08	2,47E+07	9	2,41E+08	3,53E+07
12	3,30E+08	7,59E+07	9	1,56E+08	2,43E+07
15	4,79E+08	2,10E+08	18	3,53E+08	1,19E+08
18	5,03E+08	2,88E+08	24	5,03E+08	3,09E+08
21	5,53E+08	3,60E+08	24	4,13E+08	2,27E+08
24	5,60E+08	4,79E+08	36	6,10E+08	5,70E+08
27	5,62E+08	5,01E+08	48	8,97E+08	8,17E+08
30	5,62E+08	5,17E+08	72	9,07E+08	8,60E+08
36	5,63E+08	5,17E+08			
39	5,50E+08	5,00E+08	Time (h)	Tx ( $10^9$ SBU/L)	
48	5,50E+08	5,37E+08	24	12	
54	5,67E+08	5,37E+08	36	14	
60	6,10E+08	5,37E+08	48	17	
72	6,17E+08	5,62E+08	72	18	
Time (h)	Tx ( $10^9$ SBU/L)		Time (h)	Protease (IU/mL)	
24	9		9	1,03	
36	11		24	1,49	
48	12		27	1,14	
72	13		30	0,28	
			36	0,28	
Time (h)	Protease (IU/mL)		48	0,22	
6	0,06		72	0,13	
12	0,67				
24	1,42				
30	1,83				
36	2,33				
48	2,00				
54	1,73				
60	1,47				
72	1,42				

## **ANNEXE V**

### **Raw Data**

**Influence of pH Control Agents on Entomotoxicity Potency of *Bacillus thuringiensis* using  
Different Raw Materials**



**Figure 1. Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using CUQS wastewater sludge and NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as pH control agents in a pilot scale fermentor. (A) Viable cell and spore counts, protease activity and entomotoxicity. (B) Profiles of dissolved oxygen (DO), K<sub>La</sub>, OTR and OUR. (arrow: shift of pH control from NaOH to H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

Time (h)	Spore count	Viable cell	Cell count (cfu/mL)	%sporulation
0	3,00E+04	2,94E+06	2,97E+06	1,01
3	1,53E+05	1,05E+07	1,07E+07	1,44
6	1,63E+06	1,58E+08	1,60E+08	1,02
9	2,63E+07	3,24E+08	3,50E+08	7,52
12	1,41E+08	2,49E+08	3,90E+08	36,22
15	2,80E+08	2,63E+08	5,43E+08	51,53
18	3,13E+08	2,00E+08	5,13E+08	61,04
21	3,77E+08	2,03E+08	5,80E+08	64,94
24	4,50E+08	1,50E+08	6,00E+08	75,00
30	4,43E+08	1,70E+08	6,13E+08	72,28
36	4,77E+08	1,53E+08	6,30E+08	75,66
45	4,67E+08	1,00E+08	5,67E+08	82,35
48	4,93E+08	1,13E+08	6,07E+08	81,32
Time (h)		Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)		
	12	8,16		
	24	9,90		
	36	11,56		
	48	12,92		
Time (h)		Protease (IU/mL)		
	6	0,60		
	12	0,86		
	24	1,37		
	27	2,65		
	30	2,80		
	33	3,37		
	36	2,92		
	45	2,60		
	48	2,04		
Time (h)		K <sub>La</sub> (h <sup>-1</sup> )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)
	3	163,00	0,25	1,55
	6	228,00	3,96	3,77
	12	225,80	2,52	1,24
	15	225,60	1,30	0,88
	18	223,50	0,82	0,68
	30	221,13	0,63	0,38
	36	221,12	0,51	0,28
	45	181,68	0,49	0,19

**Figure. 2. Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using CUQS wastewater sludge and NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH as pH control agents in a pilot scale fermentor.**  
**(A) Viable cell and spore counts, protease activity and entomotoxicity. (B) dissolved oxygen (DO), K<sub>La</sub>, OTR and OUR. (arrow: shift of pH control from NH<sub>4</sub>OH to CH<sub>3</sub>COOH)**

Time (h)	Spore count	Viable cell	Cell count (cfu/mL)	%sporulation
0	1,37E+04	1,45E+06	1,47E+06	0,93
3	1,07E+05	2,69E+06	2,80E+06	3,81
6	1,03E+06	1,31E+07	1,41E+07	7,32
9	2,87E+06	3,02E+07	3,31E+07	8,66
12	2,33E+07	4,73E+07	7,07E+07	33,02
21	2,20E+08	1,33E+08	3,53E+08	62,26
24	5,53E+08	4,67E+07	6,00E+08	92,22
27	5,67E+08	7,00E+07	6,37E+08	89,01
33	5,73E+08	6,33E+07	6,37E+08	90,05
36	5,70E+08	5,00E+07	6,20E+08	91,94
42	5,83E+08	9,67E+07	6,80E+08	85,78
48	6,33E+08	8,00E+07	7,13E+08	88,79

Time (h)	Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)
12	7,30
24	10,32
36	12,81
48	15,75

Time (h)	Protease (IU/mL)
6	0,49
9	1,71
12	1,95
24	2,97
30	3,75
36	3,21
42	2,73
48	2,14

Time (h)	K <sub>La</sub> (h <sup>-1</sup> )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)
3	209,4	1,64	0,21
9	250,7	4,46	3,73
12	224,3	3,12	1,92
15	204,9	2,33	1,42
18	208,0	1,97	1,39
24	189,7	1,39	1,17
30	230,45	1,65	1,06
36	204,26	1,09	0,62
45	190,7	1,11	0,53

**Figure 3. Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using JQS wastewater sludge in a pilot scale fermentor. (A) NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (B) NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH**

JQS: PH Control NaOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				JQS: PH Control NH <sub>4</sub> OH/CH <sub>3</sub> COOH			
Time (h)	Spore count (cfu/mL)	Viable cell (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)	Time (h)	Spore count (cfu/mL)	Viable cell (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)
0	1,04E+06	1,06E+06	2,10E+06	0	5,80E+05	8,20E+05	1,40E+06
3	1,29E+06	4,38E+06	5,67E+06	3	9,43E+05	2,89E+06	3,83E+06
6	2,60E+06	2,81E+07	3,07E+07	6	2,57E+06	2,01E+07	2,27E+07
9	4,57E+06	4,51E+07	4,97E+07	9	5,33E+06	3,63E+07	4,17E+07
12	3,57E+07	4,94E+07	8,51E+07	12	3,47E+07	6,83E+07	1,03E+08
21	1,92E+08	1,98E+08	3,90E+08	15	6,83E+07	9,50E+07	1,63E+08
24	2,87E+08	2,40E+08	5,27E+08	21	1,73E+08	1,17E+08	2,90E+08
27	2,93E+08	1,07E+08	4,00E+08	24	4,83E+08	1,20E+08	6,03E+08
33	3,27E+08	7,69E+07	4,04E+08	36	5,33E+08	6,70E+07	6,00E+08
36	3,60E+08	9,70E+07	4,57E+08	45	5,33E+08	6,60E+07	5,99E+08
45	3,66E+08	9,30E+07	4,59E+08	48	5,43E+08	6,70E+07	6,10E+08
48	3,67E+08	9,30E+07	4,60E+08				
<b>Time (h) Tx (10<sup>9</sup>SBU/L)</b>				<b>Time (h) Tx (10<sup>9</sup>SBU/L)</b>			
	12	7,20			12	6,77	
	24	8,20			24	9,99	
	36	9,40			36	11,33	
	48	11,24			48	13,66	
<b>Time (h) Protease (IU/mL)</b>				<b>Time (h) Protease (IU/mL)</b>			
	6	0,42			6	0,16	
	9	0,57			9	0,48	
	12	0,90			12	1,43	
	15	0,96			21	1,78	
	24	1,00			24	1,80	
	27	1,30			30	2,00	
	30	1,43			36	1,90	
	36	1,50			48	1,70	
	48	1,50					

**Figure 4. Fermentation profiles of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using soybean meal based media in a pilot scale fermentor. (A) NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (B) NH<sub>4</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH**

Soja: PH Control NaOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				Soja: PH Control NH <sub>4</sub> OH/CH <sub>3</sub> COOH			
Time (h)	Spore count (cfu/mL)	Viable cell (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)	Time (h)	Spore count (cfu/mL)	Viable cell (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)
0	9,00E+04	1,29E+07	1,30E+07	0	2,67E+04	1,30E+07	1,30E+07
3	8,33E+05	3,59E+07	3,67E+07	3	4,43E+05	1,92E+07	1,97E+07
6	2,60E+06	1,71E+08	1,73E+08	6	1,13E+06	4,89E+07	5,00E+07
9	2,43E+07	2,09E+08	2,33E+08	9	4,17E+06	1,96E+08	2,00E+08
12	1,77E+08	1,40E+08	3,17E+08	12	3,07E+07	2,39E+08	2,70E+08
15	2,50E+08	8,00E+07	3,30E+08	15	6,67E+07	2,93E+08	3,60E+08
24	3,73E+08	7,00E+07	4,43E+08	24	5,23E+08	5,73E+07	5,80E+08
36	3,83E+08	6,40E+07	4,47E+08	30	5,27E+08	5,33E+07	5,80E+08
39	4,03E+08	5,40E+07	4,57E+08	36	5,53E+08	4,80E+07	6,01E+08
42	4,10E+08	7,30E+07	4,83E+08	48	5,56E+08	5,60E+07	6,12E+08
45	4,13E+08	6,00E+07	4,73E+08				
48	4,17E+08	7,30E+07	4,90E+08				
Time (h)				Time (h)			
Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)				Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)			
12	5,87			12	5,15		
24	7,87			24	7,96		
36	8,20			36	9,92		
48	9,57			48	10,91		
Time (h)				Time (h)			
Protease (IU/mL)				Protease (IU/mL)			
6	0,40			6	0,24		
9	0,97			9	0,31		
12	1,22			12	0,60		
15	1,46			21	1,15		
24	1,21			24	1,25		
36	1,14			27	2,25		
48	1,24			36	2,31		
				42	2,22		
				48	2,16		

## **ANNEXE VI**

### **Raw Data**

**Wastewater Sludge Pre-treatment for Enhancing Entomotoxicity Produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***



**Figure 1. (A) Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and entomotoxicity potency. (B) Evolution of  $K_{La}$ , OTR and OUR. (C) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration during *Bacillus thuringiensis* growth in raw sludge**

Time (h)	Viable cell (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	Time (h)	PHB (%w/w)	
0	2,09E+06	1,47E+04	0	2,82	
3	3,97E+06	1,07E+05	3	3,01	
6	1,67E+07	1,03E+06	6	3,12	
9	3,98E+07	2,87E+06	9	3,20	
12	4,73E+07	1,63E+07	12	4,62	
15	1,21E+08	3,93E+07	15	4,96	
18	1,38E+08	1,25E+08	24	3,26	
21	1,33E+08	2,20E+08	36	3,08	
24	4,67E+07	3,53E+08	48	2,86	
27	2,67E+07	4,60E+08			
30	4,33E+07	5,17E+08	Time (h)	Protease (IU/mL)	
36	4,67E+07	5,17E+08	6	0,15	
42	5,00E+07	5,00E+08	12	0,67	
48	4,00E+07	5,37E+08	24	1,28	
			30	1,83	
Time (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)	Time (h)	
3	81,29	0,74	0,56	36	2,59
6	112,50	1,64	1,57	48	2,17
9	117,27	2,79	2,72	Time (h)	$T_x (10^9 SBU/L)$
12	110,00	0,65	0,45	24	9,1
24	109,80	0,52	0,34	36	11,2
30	109,60	0,55	0,34	48	12,3
48	102,86	0,52	0,37		

**Figure 2. (A) Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and entomotoxicity potency. (B) Evolution of  $K_{La}$ , OTR and OUR. (C) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration during *Bacillus thuringiensis* growth in thermo-alkaline pre-treated sludge**

Time (h)	Viable cell (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	Time (h)	PHB (%w/w)	
0	2,42E+06	1,70E+04	0	0,55	
3	5,22E+06	2,47E+05	3	0,57	
6	3,11E+07	2,57E+06	6	0,65	
9	2,99E+08	2,47E+07	9	0,98	
12	2,82E+08	4,80E+07	12	1,28	
15	3,70E+08	2,10E+08	15	1,21	
18	3,40E+08	2,30E+08	24	1,05	
21	6,67E+07	3,60E+08	36	1,03	
24	6,00E+07	5,40E+08	48	0,93	
27	6,00E+07	5,83E+08			
30	5,33E+07	5,23E+08	Time (h)	Protease (IU/mL)	
36	4,33E+07	6,77E+08	6	0,12	
42	5,00E+07	7,43E+08	12	0,46	
48	4,33E+07	7,90E+08	24	0,67	
			30	0,97	
Time (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)	36	1,17
3	127,06	1,49	0,94	48	1,13
6	138,84	2,25	2,18		
9	192,94	6,32	5,38	Time (h)	$T_x (10^9 SBU/L)$
12	173,22	3,47	2,54	24	11,1
24	165,56	1,52	1,40	36	13,6
30	139,63	1,27	0,98	48	16,6
48	121,27	1,20	0,81		

**Figure 3.** (A) Viable cell and spore count, PHB content, protease activity and Entomotoxicity potency. (B) Evolution of  $K_{La}$ , OTR and OUR. (C) Profiles of dissolved oxygen, stirrer speed, aeration during *Bacillus thuringiensis* growth in oxidative pre-treated sludge.

Time (h)	Viable cell (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	Time (h)	PHB (%w/w)	
0	2,22E+06	1,50E+04	0	1,31	
3	4,17E+06	1,93E+05	3	1,57	
6	2,19E+07	2,00E+06	6	1,74	
9	7,32E+07	4,43E+06	9	1,78	
24	9,89E+07	4,34E+08	12	2,79	
36	8,00E+07	4,87E+08	15	2,83	
48	5,00E+07	5,77E+08	24	2,76	
			36	2,50	
Time (h)	Tx ( $10^9$ SBU/L)		48	2,50	
24	9,3				
36	11,4				
48	13,1				
Time (h)	$K_{La}$ ( $h^{-1}$ )	OTR (mmol/l.h)	OUR (mmol/l.h)	Time (h)	Protease (IU/mL)
3	117,27	1,36	0,74	6	0,13
6	124,22	1,52	1,50	12	0,64
9	157,65	3,19	2,93	24	1,11
12	149,86	1,10	0,87	30	1,51
24	141,26	0,71	0,51	36	1,32
30	137,82	0,61	0,43	48	1,30
48	131,95	0,64	0,34		



## **ANNEXE VII**

### **Raw Data**

**Protease Synthesis and Entomotoxicity Potency in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* using sludge as a raw material.**



**Figure 1. Evolution of cell and spore counts, entomotoxicity and proteolytic activity produced at different sludge suspended solids concentrations (25g/L, 20 g/L and 15g/L)**

Sludge SS	25 g/L		20 g/L		15 g/L	
	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)	Cell count (cfu/mL)	Spore count (cfu/mL)
Time (h)						
0	2,50E+06	4,23E+04	2,40E+06	3,63E+04	2,10E+06	3,31E+04
3	1,72E+07	1,23E+05	5,63E+06	1,10E+05	4,54E+06	7,94E+04
6	1,31E+08	9,77E+05	2,27E+07	6,31E+05	1,31E+07	5,01E+05
9	2,40E+08	1,91E+07	4,17E+07	5,33E+06	2,90E+07	4,57E+06
12	2,88E+08	1,51E+08	1,03E+08	3,47E+07	5,98E+07	2,47E+07
24	5,97E+08	5,23E+08	5,33E+08	3,83E+08	3,97E+08	2,57E+08
30	5,97E+08	5,70E+08	5,70E+08	4,37E+08	4,17E+08	3,03E+08
36	6,17E+08	5,70E+08	5,80E+08	4,73E+08	4,17E+08	3,20E+08
48	6,27E+08	5,73E+08	5,80E+08	4,83E+08	4,60E+08	3,67E+08
Sludge SS	25 g/L	20 g/L	15			
Time (h)	Protease (IU/mL)	Protease (IU/mL)	Protease (IU/mL)			
6	0,70	0,65	0,42			
12	0,92	0,86	0,68			
24	1,92	1,58	1,46			
30	2,38	1,82	1,51			
36	2,82	2,31	1,60			
48	2,19	1,61	1,04			
Sludge SS	25 g/L	20 g/L	15 g/L			
Time (h)	Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)	Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)	Tx (10 <sup>9</sup> SBU/L)			
12	8	6	5			
24	11	9	8			
36	12	11	9			
48	13	12	10			