

Institut National de la Recherche Scientifique

INRS – Centre Eau, Terre et Environnement

**HYDROLYSE ET OXYDATION PARTIELLE DES BOUES D'ÉPURATION COMME
SUBSTRAT POUR PRODUIRE BACILLUS THURINGIENSIS HD-1**

Par

Simon Barnabé

Thèse présentée

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

Jury d'évaluation

Examineurs externes

Jean-Louis Schwartz, Ph.D.

Université de Montréal

Jean-Charles Côté, Ph.D.

Centre de recherche et développement en
horticulture, AAFC

Examineur interne

Jean-François Blais, Ph.D.

INRS-ETE

Directeur de recherche

Rajeshwar D. Tyagi, Ph.D.

INRS-ETE

Codirecteur de recherche

José R. Valéro, Ph.D.

Centre de foresterie des Laurentides, RNCan



PRÉFACE

Ce travail fait l'objet d'une demande de brevet (*Barnabé, S., A.S. Vidyarthi, R.D. Tyagi et J.R. Valéro. 2001. Culture media for growing Bacillus thuringiensis and methods using same. USPTO patent demand no. 10371.71, Goudreau Gage Dubuc – GGD, INRS, Univ. du Québec*). Il doit rester confidentiel jusqu'à son approbation finale.

Il est important de noter qu'un facteur de correction de +20,25% doit être appliqué sur les résultats d'entomotoxicité contenus dans le présent travail. Les entomotoxicités ont été calculées avec le potentiel insecticide du FORAY 76B, soit 20077 UI/μl, selon la méthode d'incorporation dans la diète proposée par Dulmage et al. (1971). Cette valeur est cependant attribuée à l'entomotoxicité envers les larves de la fausse-arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*) et ne correspond pas aux larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* et *Choristoneura occidentalis*), soit les larves d'insecte à la base des bio-essais de ce travail. Un bio-essai a été effectué avec *Choristoneura fumiferana* et *Trichoplusia ni* pour déterminer l'entomotoxicité du FORAY 76B envers les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Yezza, 2004). Les résultats indiquent que les larves de *C. fumiferana* seraient plus sensibles que celles de *T. ni* (+20,25%). Cette différence n'affecte en rien l'interprétation des résultats dans le présent travail.



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur Rajeshwar D. Tyagi, et mon codirecteur, Dr José R. Valéro, pour m'avoir aidé à concrétiser mon projet de doctorat. Je les remercie pour leur confiance et leur mentorat. Nous collaborons ensemble depuis plusieurs années sur un projet aux retombées socio-économiques très importantes. Je les remercie tout spécialement de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel projet et de m'avoir permis d'élaborer l'approche visant la production de biopesticides à partir de boues d'épuration qu'ils avaient instaurée en 1994.

Je saisis cette occasion pour remercier diverses gens qui m'ont soutenu durant mes études : le Dr Michèle Bernier-Cardou, statisticienne au Service Canadien des Forêts de Ressources Naturelles Canada à Sainte-Foy, le professeur Marius Lachance de l'INRS-ETE et M. Renaud Patry. L'aide technique des personnes suivantes a fortement été appréciée : Marie-Eve Leblanc, Guillaume Dufresne, Thomas Jeanne, Anne Kacymaryk, Patrice Cham, Laura Delfosse, Mathieu Beauregard, Laetitia Debelle, Cyrielle Roch, Marie-Eve Bessette et Martin Landry. Je remercie les membres de mon équipe de recherche, soit Islem Yezza, Mausam Verma et Satinder Brar, ainsi que le personnel de l'INRS-ETE, soit Pauline Fournier, Michèle Bordeleau, René Rodrigue, Stéphane Prémont, Lise Rancourt et Sébastien Duval pour leur support moral et technique. Mes remerciements s'adressent également à mon ancien collègue Dr Ambarish Vidyarthi pour ses conseils, son support moral et son aide technique au début de mes études doctorales.

Je tiens à remercier le CRSNG ainsi que les partenaires industriels, soit la Financière des Sciences et des Technologies et la Corporation Biolix Inc., pour leur support financier. Je tiens aussi à remercier l'équipe de Bob McCron du Service Canadien des Forêts de Ressources Naturelles Canada à Sault-Sainte-Marie (Ontario) et Denis Simoneau de la division de la conservation des forêts du Ministère de l'environnement du Québec.

Finalement, je remercie ma famille, ma belle-famille et tous mes amis pour leur soutien et leur encouragement durant la réalisation de ce travail. Je remercie tout particulièrement ma conjointe, Isabel, pour sa patience et toute l'attention qu'elle me porte.



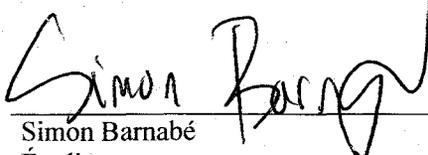
RÉSUMÉ

Dans la conjoncture actuelle, le développement démographique couplé à la mondialisation croissante de l'économie consomment à un rythme effrayant des ressources et génère des tonnes de déchets dont il faut disposer de façon sécuritaire et économique. L'intégration de la fabrication de produits à valeur ajoutée comme méthode économique pour valoriser les déchets est une solution durable aux problèmes d'exploitation massive des ressources renouvelables ou non renouvelables et de la gestion des résidus. Effectivement, certains déchets comme les boues d'épuration peuvent devenir une matière première abondante, économique et porteuse de caractéristiques nutritives stimulantes pour l'obtention de produits microbiens. Dans ce contexte, un procédé de bioconversion des boues d'épuration municipales en bio-insecticide (*B. thuringiensis* ou Bt) a été développé à l'INRS-ETE et s'apprête à être commercialisé. Ce bioprocédé, appelé temporairement « procédé BT-INRS », utilise les boues d'épuration comme matière première pour produire à coût moindre une souche entomopathogène de Bt. Ce procédé innovateur est au prise avec deux facteurs qui limitent le rendement de Bt en termes d'entomotoxicité, de spores produites et d'activité protéolytique. La faible disponibilité des éléments nutritifs dans les boues pourrait être accrue afin que Bt puisse produire à pleine capacité ses produits insecticides. De plus, le procédé ne peut pas utiliser des boues contenant plus de 25 g/l de matière en suspension (MES) en raison des caractéristiques rhéologiques des boues. Une plus forte concentration en MES fournirait à Bt plus d'éléments nutritifs pour produire davantage de produits insecticides. Finalement, une question persiste sur la performance du procédé BT-INRS : malgré une concentration en spores de Bt inférieure au milieu conventionnel à base de soja, pourquoi une plus forte entomotoxicité est observée dans les boues ? Des auteurs scientifiques ont démontré une corrélation positive entre les spores et l'entomotoxicité, alors que d'autres affirment qu'il n'en existe pas. Il est important de vérifier où le procédé BT-INRS se situe dans ces allégations.

Le présent projet avait pour but de développer une stratégie pour améliorer le rendement de Bt dans les boues d'épuration. La stratégie développée consiste en une hydrolyse (alcaline ou thermo-alcaline), seule ou en combinaison avec une oxydation partielle (utilisant du H₂O₂ comme agent oxydant). Elle parvient à accroître considérablement le rendement de Bt dans les boues. Des analyses sur la composition des boues après leur traitement ont été effectuées afin de déceler les facteurs responsables des hausses de rendements. Finalement, des tests d'entomotoxicité sur les différentes fractions des boues fermentées par Bt (culot, surnageant, spores et cristaux protéiques purifiés) et du milieu conventionnel de production (à base de soja) ont été réalisés pour expliquer les hausses d'entomotoxicité et définir avec détails la relation spore-entomotoxicité dans les boues.

Les boues mixtes et secondaires du traitement des eaux usées municipales ont été utilisées dans ce travail comme milieu de fermentation pour produire la souche entomopathogène HD-1 du sérovar *kurstaki* de *Bacillus thuringiensis* (Btk HD-1). L'hydrolyse acide, alcaline et thermique ainsi que l'oxydation avec H₂O₂ ont été proposées et testées. Suite à des essais préliminaires, l'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse thermo-alcaline et la combinaison de l'hydrolyse thermo-alcaline avec l'oxydation partielle ont été sélectionnées parce qu'elles augmentaient de plus de 50% l'entomotoxicité de Btk HD-1 dans les boues mixtes et/ou secondaires. La solubilisation des protéines et du carbone organique, la présence de forte teneur en sodium après les hydrolyses ainsi que la réduction de la viscosité ont été identifiés comme les facteurs responsables de ces augmentations. Les traitements ont ensuite été optimisés en fioles Erlenmeyer avec un plan composite centré et la méthodologie de réponse en surface. Des conditions optimales ont été établies pour chaque traitement et elles ont été vérifiées en fioles Erlenmeyer. Finalement, les conditions optimales de l'hydrolyse alcaline et thermo-alcaline ainsi que du traitement thermo-oxydant ont été éprouvées avec succès en fermenteur de 15 litres. Des entomotoxicités entre $17,4 \times 10^3$ et $19,0 \times 10^3$ UI/ μ l ont été obtenues dans les boues traitées (contenant jusqu'à 37,4 g MES/l), soit de 37% à 49% supérieures aux boues non traitées (25 g MES/l) et de 1,7 à 1,9 fois supérieures au milieu conventionnel à base de soja.

Ce travail a permis de conclure que l'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse thermo-alcaline et la combinaison de l'hydrolyse thermo-alcaline avec l'oxydation partielle sont trois traitements des boues qui accroissent le rendement de Btk HD-1 cultivée dans les boues d'épuration, spécialement en terme d'entomotoxicité. Elles permettent aussi d'utiliser une plus grande concentration de MES pour la culture de Btk dans les boues. De plus, les boues stimulent la formation de spores, de cristaux protéiques insecticides et de métabolites insecticides solubles de Btk HD-1 qui sont plus actifs en terme d'entomotoxicité. Les boues secondaires, hydrolysées ou non hydrolysées, permettent d'obtenir des entomotoxicités spécifiques (par spores ou protéines solubles) plus élevées que dans le milieu soja. Les spores de Btk HD-1 produites dans les boues d'épuration mixtes sont plus entomotoxiques que celles produites dans les boues secondaires et le milieu conventionnel à base de soja. Les cristaux protéiques insecticides de Btk HD-1 produits dans les boues secondaires sont plus entomotoxiques que ceux produites dans les boues mixtes et le milieu conventionnel à base de soja. La stratégie développée dans le cadre de ce travail fait l'objet d'une demande de brevet.


Simon Barnabé
Étudiant


Rajeshwar D. Tyagi
Directeur de Recherche

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE.....	III
REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VII
TABLE DES MATIÈRES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES ÉQUATIONS.....	XXIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XXV
GLOSSAIRE.....	XXIX
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: BIOCONVERSION DES BOUES D'ÉPURATION EN BIOPESTICIDE.....	3
1.1 CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL ET SOCIO-ÉCONOMIQUE.....	3
1.1.1 <i>L'épuisement des ressources</i>	3
1.1.2 <i>Les boues d'épuration : source d'approvisionnement alternative ?</i>	5
1.1.3 <i>Les pesticides : marchés à conquérir pour la bio-industrie émergente</i>	7
1.2 PROCÉDÉ BT-INRS.....	8
1.2.1 <i>Stratégies de production</i>	11
1.2.2 <i>Des produits microbiens plus performants ?</i>	12
1.2.3 <i>Les boues d'épuration municipales : une matière première universelle, mais un défi pour la fermentation industrielle</i>	14
1.2.3.1 <i>La biodisponibilité des éléments nutritifs dans les boues</i>	14
1.2.3.2 <i>Concentration de la matière en suspension des boues</i>	15
CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE.....	17
2.1 <i>BACILLUS THURINGIENSIS : UNE BACTÉRIE PIONNIÈRE DE LA LUTTE BIOLOGIQUE</i>	17
2.1.1 <i>Caractéristiques générales</i>	18
2.1.2 <i>Les spores</i>	20
2.1.2.1 <i>Structure et composition de la spore</i>	20
2.1.2.2 <i>Sporulation</i>	21
2.1.2.3 <i>Entomotoxicité des spores</i>	24
2.1.3 <i>Les delta-endotoxines</i>	25
2.1.3.1 <i>Structure des cristaux et classement des delta-endotoxines</i>	25
2.1.3.2 <i>Formation des cristaux</i>	26
2.1.3.3 <i>Entomotoxicité des cristaux protéiques insecticides</i>	29
2.1.4 <i>Les protéases</i>	32
2.1.4.1 <i>Généralités</i>	32
2.1.4.2 <i>Protéases de Bt</i>	33
2.1.4.3 <i>Formation des protéases</i>	34
2.1.5 <i>Autres facteurs de virulence</i>	34
2.1.6 <i>Milieux de culture alternatifs pour la production de Bt</i>	36
2.2 <i>TRAITEMENTS DES BOUES D'ÉPURATION DES EAUX USÉES</i>	38
2.2.1 <i>Constituants des boues d'épuration</i>	38
2.2.2 <i>Effets des traitements</i>	39

2.2.2.1 Biodégradabilité.....	41
2.2.2.2 Propriétés physiques	41
2.2.2.2.1 Influence sur le transfert de l'oxygène	42
2.2.2.2.2 Influence sur le transfert des éléments nutritifs.....	43
2.2.2.2.3 Inhibition par le substrat.....	44
2.2.2.3 Hydrolyse.....	45
2.2.2.3.1 Traitement acide.....	47
2.2.2.3.2 Traitement alcalin.....	47
2.2.2.3.3 Traitement thermique.....	49
2.2.2.4 Oxydation partielle et totale.....	51
2.2.3 Récapitulation sur les traitements.....	54
CHAPITRE 3: BUT ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	55
3.1 BUT DU PROJET	55
3.2 HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	55
3.3 OBJECTIFS DE RECHERCHE	57
CHAPITRE 4: MÉTHODOLOGIE.....	59
4.1 BOUES D'ÉPURATION DES EAUX USÉES MUNICIPALES	59
4.1.1 Échantillonnage.....	59
4.1.2 Analyse des caractéristiques physico-chimiques des boues.....	59
4.1.3 Composition des boues	60
4.2 TRAITEMENTS DES BOUES D'ÉPURATION.....	62
4.2.1 Valeurs initiales des variables expérimentales de chaque traitement	62
4.2.2 Hydrolyse acide.....	63
4.2.3 Hydrolyse alcaline.....	63
4.2.4 Hydrolyse thermique.....	63
4.2.4.1 Petits volumes.....	63
4.2.4.2 Grands volumes	64
4.2.5 Traitement oxydant.....	65
4.2.6 Hydrolyse thermique et traitement oxydant.....	65
4.3 PRODUCTION DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	66
4.3.1 Souche bactérienne à l'étude.....	66
4.3.2 Culture de départ et inoculum	66
4.3.3 Expériences en fioles Erlenmeyer.....	67
4.3.4 Expériences en fermenteur.....	67
4.3.5 Paramètres expérimentaux.....	69
4.3.5.1 Cellules et spores viables	69
4.3.5.2 Entomotoxicité.....	69
4.3.6 Autres mesures expérimentales.....	72
4.3.6.1 Taux de croissance.....	72
4.3.6.2 Le coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène	72
4.3.6.3 Suivi de la rhéologie des boues durant la culture en fermenteur.....	73
4.3.6.4 Activité protéolytique	73
4.4 OPTIMISATION DES TRAITEMENTS DES BOUES.....	74
4.5 PRÉPARATION DES SUSPENSIONS DE SPORES ET DE CRISTAUX DE BT.....	74
4.5.1 Centrifugation du bouillon fermenté.....	75
4.5.2 Purification des spores	76
4.5.3 Purification des CPI.....	76
4.5.3.1 Traitement ultrasonique	77
4.5.3.2 Ultracentrifugation avec gradients de sucrose	77

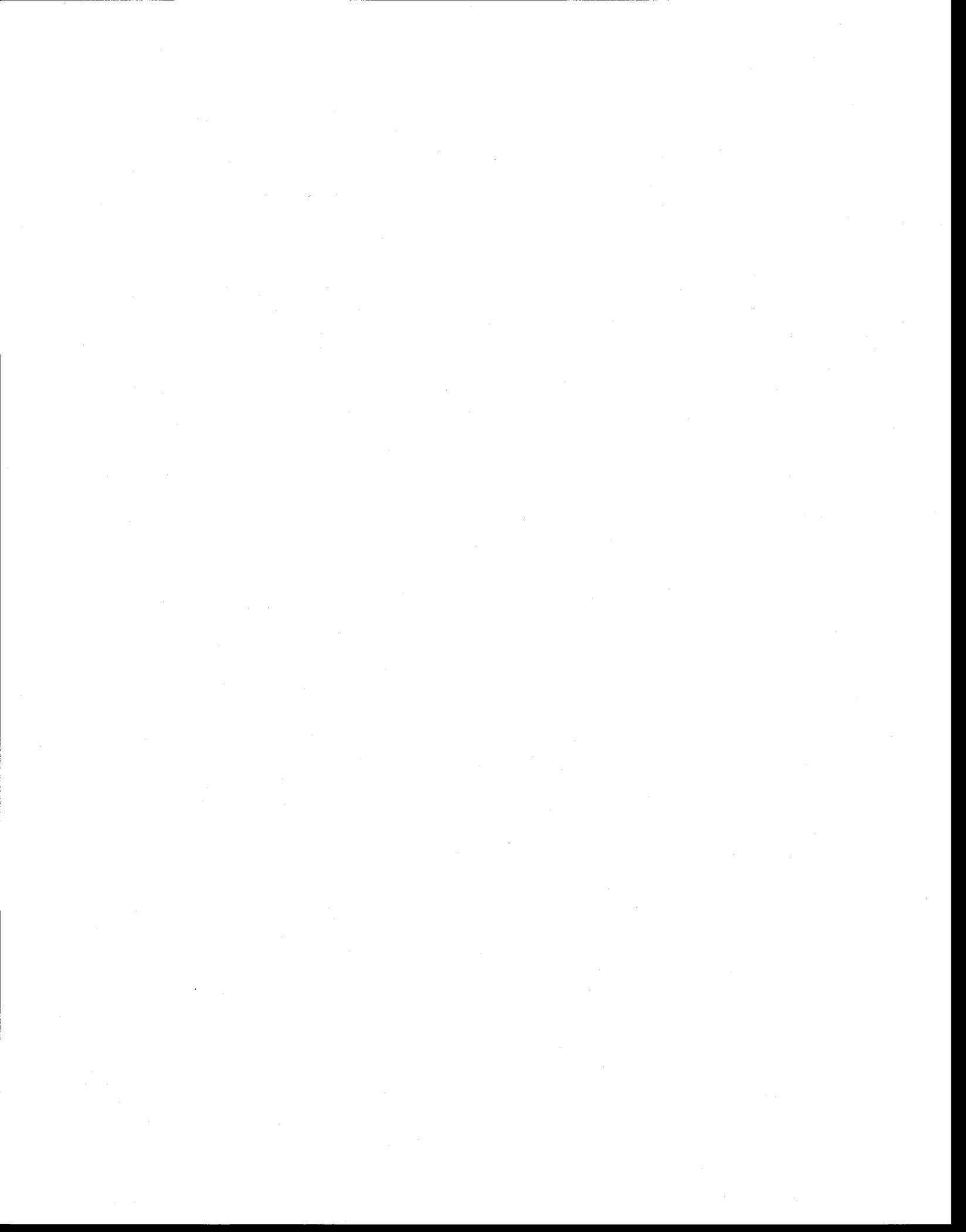
5.1 SÉLECTION DES MEILLEURS TRAITEMENTS	79
5.1.1 Résultats avec les boues mixtes (BEM)	81
5.1.1.1 Expériences contrôles avec les boues mixtes (Cont25 et Cont35).....	83
5.1.1.2 Hydrolyse acide des boues mixtes (Ac25pH2, Ac25pH4...).....	83
5.1.1.3 Hydrolyse alcaline des boues mixtes (Al25pH10, Al25pH12...).....	83
5.1.1.4 Hydrolyse thermique des boues mixtes (Th25t140, Th25t160...).....	84
5.1.1.5 Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes (Tha25t140, Tha25t160...).....	84
5.1.1.6 Traitement oxydant des boues mixtes (Oxy25c0.01, Oxy25c0.03...).....	84
5.1.1.7 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes (Tho25c0.01, Tho25c0.03...).....	85
5.1.2 Résultats avec les boues secondaires	85
5.1.2.1 Expériences contrôles sur les boues secondaires (Cont25 et Cont35).....	87
5.1.2.2 Hydrolyse acide des boues secondaires (Ac25pH2, Ac25pH4...).....	87
5.1.2.3 Hydrolyse alcaline des boues secondaires (Al25pH10, Al25pH12...).....	87
5.1.2.4 Hydrolyse thermique des boues secondaires (Th25t140, Th25t160...).....	87
5.1.2.5 Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires (Tha25t140, Tha25t160...).....	88
5.1.2.6 Traitement oxydant des boues secondaires (Oxy25c0.01, Oxy25c0.03...).....	88
5.1.2.7 Traitement thermo-oxydant des boues secondaires (Tho25c0.01, Tho25c0.03...).....	88
5.2 EFFETS DES TRAITEMENTS SUR LE POTENTIEL NUTRITIF DES BOUES	89
5.2.1 Influence sur le contenu en C _i et COD, et le ratio C/N	89
5.2.2 Influence sur la biodégradabilité	91
5.2.3 Influence sur la viscosité	93
5.2.4 Influence sur le contenu en azote et protéines.....	94
5.2.5 Influence sur la concentration en métaux dissous et autres éléments inorganiques dissous.....	97
5.2.6 Influence sur les MES et MVES.....	101
5.3 DISCUSSION	102
5.3.1 Effets de l'hydrolyse acide.....	104
5.3.1.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH acide.....	104
5.3.1.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH acide.....	105
5.3.2 Effets de l'hydrolyse alcaline	106
5.3.2.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH alcalin.....	106
5.3.2.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH alcalin.....	107
5.3.3 Effets de l'hydrolyse thermique.....	108
5.3.3.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à température élevée.....	108
5.3.3.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à température élevée.....	110
5.3.4 Effets de l'hydrolyse thermo-alcaline.....	111
5.3.4.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH alcalin et température élevée.....	111
5.3.4.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH alcalin et température élevée.....	112
5.3.5 Effets du traitement oxydant.....	113
5.3.5.1 Fermentation des boues mixtes oxydées partiellement.....	113
5.3.5.2 Fermentation des boues secondaires oxydées partiellement.....	114
5.3.6 Effets du traitement thermo-oxydant	114
5.3.6.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées et oxydées partiellement.....	114
5.3.6.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées et oxydées partiellement.....	115
5.3.7 Effets de la stérilisation sur les caractéristiques des boues	116
5.3.8 Caractéristiques communes des meilleurs traitements.....	117
5.3.8.1 Diminution de la viscosité	117
5.3.8.2 Solubilisation partielle des protéines, du carbone organique et des éléments traces inorganiques	118
5.3.8.3 Effets spécifiques au type de boue.....	118
5.3.9 Récapitulation sur les expériences préliminaires et les effets des traitements sur les boues	119

6.1 MÉTHODES STATISTIQUES	123
---------------------------------	-----

6.1.1 Plan composite centré.....	124
6.1.2 Planification expérimentale.....	126
6.1.2.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires.....	128
6.1.2.2 Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes et secondaires.....	129
6.1.2.3 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes et secondaires.....	130
6.1.3 Méthodologie de réponse en surface.....	130
6.2 RÉSULTATS EN FIOLES ERLÉNMEYER.....	132
6.2.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires.....	132
6.2.2 Hydrolyse thermo-alcaline.....	136
6.2.2.1 Boues mixtes.....	136
6.2.2.2 Boues secondaires.....	140
6.2.3 Traitement thermo-oxydant.....	143
6.2.3.1 Boues mixtes.....	143
6.2.3.2 Boues secondaires.....	146
6.2.4 Discussion sur les travaux d'optimisation.....	150
6.2.4.1 Précision et adéquation des modèles polynomiaux.....	150
6.2.4.2 Entomotoxicités observées lors des essais préliminaires vis-à-vis celles observées aux points centraux des PCC.....	151
6.2.4.3 Détermination des valeurs optimales.....	152
6.2.4.4 Effets significatifs des paramètres des traitements sur l'entomotoxicité.....	154
6.2.4.4.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires.....	154
6.2.4.4.2 Hydrolyse thermo-alcaline des BEM.....	155
6.2.4.4.3 Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires.....	156
6.2.4.4.4 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes.....	156
6.2.4.4.5 Traitement thermo-oxydant des boues secondaires.....	156
6.2.4.5 Commentaires sur les méthodes expérimentales statistiques pour l'optimisation des traitements en vue d'accroître l'entomotoxicité de Bt.....	157
6.3 VALIDATION DES CONDITIONS OPTIMALES DES TRAITEMENTS.....	158
6.3.1 Expériences de validation en fioles Erlenmeyer.....	158
6.3.1.1 Résultats.....	158
6.3.1.2 Discussion.....	162
6.3.2 Essais en fermenteur.....	165
6.3.2.1 Résultats.....	166
6.3.2.2 Discussion.....	175
6.3.2.2.1 Croissance cellulaire.....	175
6.3.2.2.2 Sporulation.....	177
6.3.2.2.3 Coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène.....	179
6.3.2.2.4 Entomotoxicité.....	180
6.3.2.2.5 Activité protéolytique.....	182
6.3.2.2.6 Viscosité.....	184
6.3.2.2.7 Taille des particules.....	186
6.3.2.2.8 Type d'énergie thermique utilisée pour l'hydrolyse.....	187
6.3.2.2.9 Quantité de NaOH consommée durant la fermentation.....	188
6.3.2.2.10 Formation de mousse.....	189
6.3.2.2.11 Impacts potentiels d'un traitement des boues sur le coût de production de Bt.....	191
CHAPITRE 7: ÉVALUATION DE L'ENTOMOTOXICITÉ DES SPORES ET DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DE BT HD-1 PRODUITS DANS LES BOUES D'ÉPURATION.....	193
7.1 CHOIX DES MÉTHODES.....	193
7.2 RÉSULTATS.....	195
7.3 DISCUSSION.....	198
7.3.1 Entomotoxicité du surnageant des bouillons fermentés.....	198
7.3.1.1 Présence d'exotoxines et d'entérotoxine.....	199
7.3.1.2 Présence de protéases.....	200

7.3.1.3 Présence de chitinases	201
7.3.1.4 Présence de protéines insecticides végétatives	201
7.3.1.5 Présence d'antibiotiques	201
7.3.1.6 Importance du surnageant des boues fermentées par Bt	202
7.3.2 <i>Entomotoxicité du culot des bouillons fermentés ainsi que des spores et des cristaux protéiques purifiés</i>	203
7.3.2.1 Spores et cristaux produits dans le milieu soja	204
7.3.2.2 Spores et cristaux produits dans les boues mixtes	204
7.3.2.3 Spores et cristaux produits dans les boues secondaires	205
7.3.2.4 Importance des nouvelles fonctionnalités des spores et des cristaux de Bt produits dans les boues d'épuration	206
CONCLUSIONS	207
RECOMMANDATIONS	211
RÉFÉRENCES	215

ANNEXE 1	BARNABÉ ET AL., 2003 ET 2004
ANNEXE 2	INFORMATION COMPLÉMENTAIRE SUR LES ENDOSPORES
ANNEXE 3	CONSULTATION DE TRAVAUX SUR LA RELATION ENTRE LES SPORES ET L'ENTOMOTOXICITÉ
ANNEXE 4	INFORMATION COMPLÉMENTAIRE SUR LES PROTÉASES
ANNEXE 5	CATÉGORIES DE TRAITEMENTS DES BOUES D'ÉPURATION
ANNEXE 6	INFORMATION COMPLÉMENTAIRE SUR LE MATÉRIEL ET LES MÉTHODES
ANNEXE 7	DONNÉES DES EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES EN FIOLES ERLLENMEYERS
ANNEXE 8	DONNÉES DES TRAVAUX D'OPTIMISATION
ANNEXE 9	DONNÉES DES EXPÉRIENCES EN FERMENTEUR
ANNEXE 10	DONNÉES DES EXPÉRIENCES SUR L'ENTOMOTOXICITÉ DES DIVERSES SUSPENSIONS DE BTK HD-1, DES SPORES ET DES CRISTAUX PURIFIÉS



LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Stratégies développées pour augmenter le rendement du procédé BT-INRS. Valeurs approximatives de l'entomotoxicité et des spores de Btk après 48h de fermentation de boues secondaires contenant environ 25 g/l de matières en suspension. Comparaison avec le milieu conventionnel à base de soja pour la production de Btk et le Foray 76B.....	12
Tableau 2	Quelques facteurs influençant la sporulation de Bt	23
Tableau 3	Quelques facteurs influençant la production de cristaux protéiques insecticides (CPI) de Bt.....	28
Tableau 4	Autres métabolites secondaires de Bt susceptibles de contribuer à l'entomotoxicité.....	35
Tableau 5	Méthodes utilisées pour l'analyse des caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration.....	60
Tableau 6	Composition des boues mixtes et secondaires de la Station d'épuration Est de la Ville de Québec (Québec, Canada).....	61
Tableau 7	Conditions expérimentales et codes associés à chacune des expériences préliminaires sur les traitements. Les caractères gras représentent les paramètres pour lesquels différentes valeurs sont testées.	80
Tableau 8	Expériences réalisées sur la composition des boues après divers traitements. Avant les analyses, les boues traitées ou non traitées ont été ajustées à pH neutre et stérilisées. Les traitements ont été appliqués sur les boues d'épuration mixtes (BEM) et secondaires (BES). Les expériences ont été réalisées en duplicata.	89
Tableau 9	Comparaison de quelques caractéristiques des boues brutes et stérilisées.	117
Tableau 10	Composantes du plan composite centré.....	125
Tableau 11	Valeurs des variables indépendantes aux différents points du PCC pour optimiser l'hydrolyse alcaline des BES.	128
Tableau 12	Expériences pour optimiser l'hydrolyse alcaline des BES préparées selon un PCC factoriel (2^4) avec huit points étoiles. Sept réplifications sont prévues au point du centre. Variables indépendantes : $X_1 = \text{MES (g/l)}$; $X_2 = \text{pH}$; $X_3 = \text{température (°Celsius)}$; $X_4 = \text{durée (h)}$	128
Tableau 13	Valeurs des variables indépendantes aux différents points du PCC pour optimiser l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM et des BES.....	129
Tableau 14	Expériences pour optimiser l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM et des BES préparées selon un PCC factoriel (2^4) avec huit points étoiles. Sept réplifications sont prévues au point du centre. Variables indépendantes : $X_1 = \text{MES (g/l)}$; $X_2 = \text{pH}$; $X_3 = \text{température (°Celsius)}$; $X_4 = \text{durée (min)}$	129
Tableau 15	Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse alcaline des BES. Variables indépendantes : $X_1 = \text{MES (g/l)}$; $X_2 = \text{pH de l'hydrolyse}$; $X_3 = \text{temp. (°Celsius) de l'hydrolyse}$; $X_4 = \text{durée (min) de l'hydrolyse}$	133

Tableau 16	Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficients de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse alcaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.	134
Tableau 17	Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse alcaline des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.	136
Tableau 18	Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min.) de l'hydrolyse.....	137
Tableau 19	Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficients de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse ; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.	138
Tableau 20	Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.....	140
Tableau 21	Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alcaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.....	141
Tableau 22	Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse thermo-alcaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse ; X_3 = température ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.	142
Tableau 23	Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse thermo-alcaline des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.....	143
Tableau 24	Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.....	144
Tableau 25	Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour le traitement thermo-oxydant des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.	145

Tableau 26	Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes du traitement thermo-oxydant des BEM pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.....	146
Tableau 27	Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.....	147
Tableau 28	Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour le traitement thermo-oxydant des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.....	148
Tableau 29	Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes du traitement thermo-oxydant des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.....	150
Tableau 30	Résultats des essais en fioles Erlenmeyer pour vérifier les conditions optimales pour chaque traitement. Fermentation par Btk HD-1 des boues d'épuration mixtes (BEM) et secondaires (BES) ainsi que du milieu semi-synthétique à base de soja. Résultats après 48h de fermentation. Les valeurs sont les moyennes de deux réplifications.....	159
Tableau 31	Hypothèses plausibles quant à la production de spores et de métabolites insecticides en grande quantité et/ou plus fonctionnels dans les boues d'épuration.....	163
Tableau 32	Validation des conditions optimales des traitements sur les boues secondaires (BES) en fermenteur (volume total de 15 litres, volume de travail de 10 litres). Résultats après 48h. Comparaison avec les boues secondaires non traitées et le milieu synthétique à base de soja.....	166
Tableau 33	Entomotoxicité et activité protéolytique spécifiques de Btk HD-1 dans le milieu conventionnel à base de soja et dans les boues secondaires traitées et non traitées. .	167
Tableau 34	Essais en fioles Erlenmeyer avec les boues secondaires hydrolysées par injection de vapeur (suivie d'une stérilisation). Résultats après 48h de fermentation par Btk HD-1. Comparaison avec les essais de validation en Erlenmeyer (boues hydrolysées par micro-onde). TAS = hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires ; TOS = traitement thermo-oxydant des boues secondaires.....	188
Tableau 35	Quelques recommandations pour les recherches à venir sur le traitement des boues et leur bioconversion en produits à valeur ajoutée.....	211

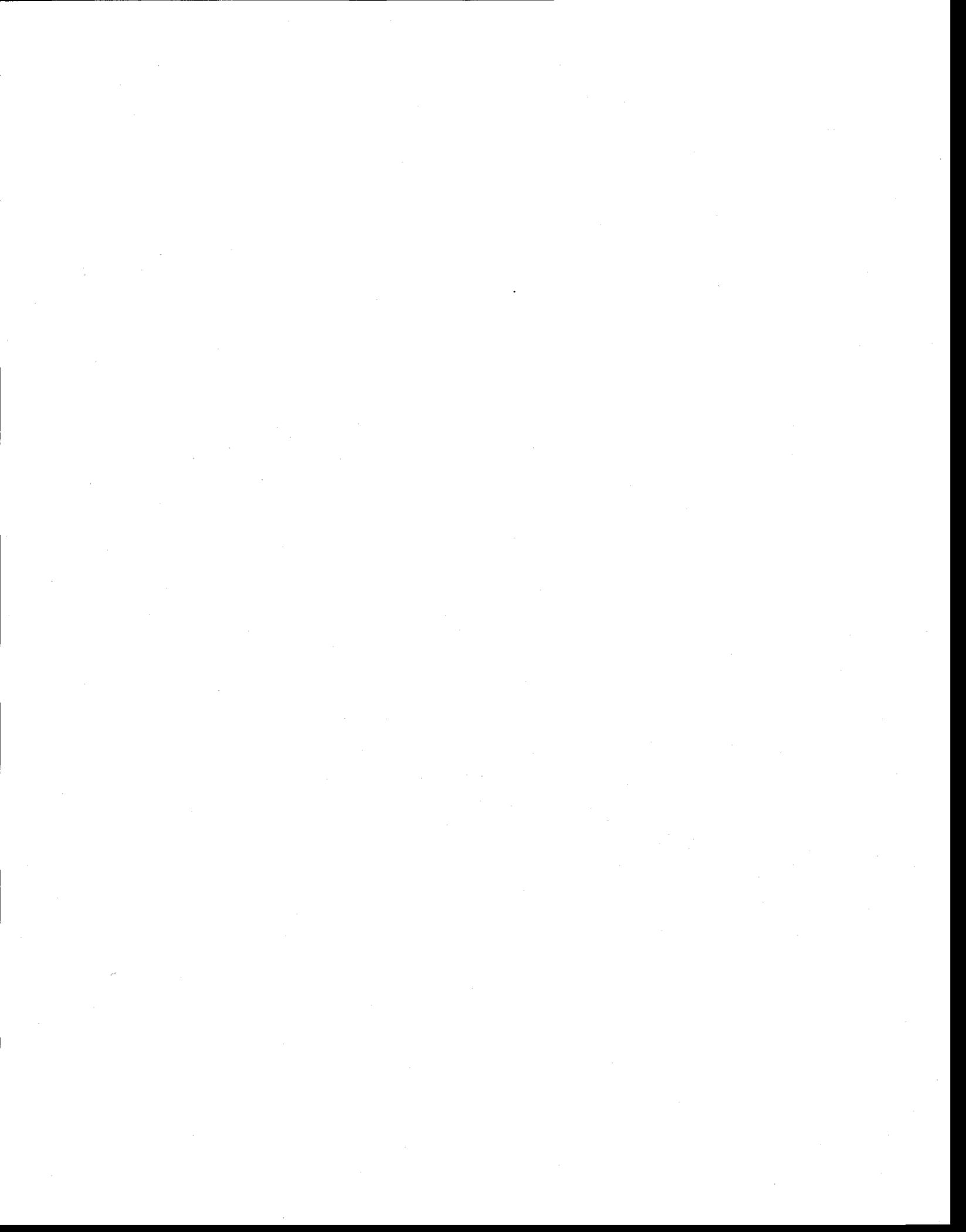


LISTE DES FIGURES

Figure 1	Cellules, spores et cristaux protéiques insecticides de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . Microscopie à contraste d'interférence différentielle (X1600). Image modifiée avec le logiciel Adobe Photoshop de Adode Systems Inc. (É.-U.).....	18
Figure 2	Schéma de la sporulation et de la production des CPI de Bt (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Piggot et Coote, 1976 ; Bulla et al., 1980 ; Sneath, 1984 ; Slepecky et Hemphill, 1992 ; Piggot et al., 1994). Étape 1 : synthèse de l'ADN et formation d'un filament axial de chromatine par la condensation de deux nucléotides supportés par les mésosomes. Étape 2 : formation d'un septum par l'invagination de la membrane à l'une des extrémités de la cellule et début de la synthèse du/des CPI parasporaux. Étape 3 : formation du protoplaste (spore avec une membrane cytoplasmique libre dans la cellule) et assemblage des sous-unités protéiques du CPI. Étape 4 : production de la membrane cellulaire et du cortex autour du protoplaste sporal et augmentation de la taille du cristal. Étape 5 : synthèse des couches protéiques sporales et fin de la synthèse du CPI. Étape 6 : maturation de la spore, accroissement de sa réfringence et de sa résistance (chaleur, solvants inorganiques...), déshydratation et accumulation du DAP et du Ca ²⁺ . Étape 7 : Lyse de la cellule et libération de la spore et du CPI.....	22
Figure 3	Hydrolyseur de 10 litres conçu par EBR (Québec, Canada).....	64
Figure 4	Fermenteur de 15 litres (volume de travail de 10 litres) de Biogénie (Québec, Canada).....	68
Figure 5	Bioessai pour évaluer l'entomotoxicité de Btk HD-1 sur les larves de la TBE.....	71
Figure 6	Concentration en spores viables, pourcentage de sporulation, entomotoxicité des suspensions de Btk HD-1 obtenues après 48 h de fermentation de boues mixtes d'épuration de la Ville de Québec, traitées ou non traitées. Essais préliminaires en fioles Erlenmeyer pour sélectionner les meilleurs traitements à optimiser.....	82
Figure 7	Concentration en spores viables, pourcentage de sporulation et entomotoxicités des suspensions de Btk HD-1 obtenues après 48 h de fermentation de boues secondaires d'épuration de la Ville de Québec, traitées ou non traitées. Essais préliminaires en fioles Erlenmeyer pour sélectionner les meilleurs traitements à optimiser.	86
Figure 8	Effets des traitements sur le contenu en carbone total (C _{total}) et en carbone organique dissous (COD), et sur le ratio C _r /N _t des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).....	90
Figure 9	Effets des traitements sur la biodégradabilité (quantité de matières volatiles en suspension ou MVES dégradées après 5 jours exprimée en pourcentage) des boues épaissies (BEM) et secondaires (BES).	92
Figure 10	Effets des traitements sur la viscosité (exprimée en centipoise) des boues épaissies (BEM) et secondaires (BES).....	93
Figure 11	Effets des traitements sur la concentration en azote d'ammonium (N-NH ₄ ⁺), en azote organique et nitrique (N organique + N-NO _x) et en azote total (N _{total}) des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).....	94

Figure 12	Effets des traitements sur le contenu en protéines solubles des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).....	96
Figure 13	Effets des traitements sur la solubilisation de différents métaux traces présents dans les mixtes (BEM) et secondaires (BES).....	98
Figure 14	Effets des traitements sur la solubilisation de différents éléments inorganiques présents dans les boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).	100
Figure 15	Effets des traitements sur les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES) contenues dans les boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).	101
Figure 16	Illustration d'un plan composite centré : (A) PCC avec 2 variables indépendantes ; (B) PCC avec 3 variables indépendantes.....	125
Figure 17	Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction du pH et de la température de l'hydrolyse alcaline des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g MES/l et 24h.....	135
Figure 18	Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM où les valeurs (fixes) du pH et de la température de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 10 et 140°C.....	139
Figure 19	Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction du pH et de la durée de l'hydrolyse thermo-alcaline du traitement thermo-oxydant des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la température de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g/l et 140°C.	149
Figure 20	Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction du pH et de la température de l'hydrolyse thermo-alcaline du traitement thermo-oxydant des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g/l et 30 min.....	153
Figure 21	Validation en fioles Erlenmeyer des conditions optimales pour chaque traitement afin de maximiser le rendement en entomotoxicité de Btk HD-1 cultivées dans les boues. Écart type des valeurs observées calculées avec l'erreur de la méthode des bio-essais (7%). TAM = Hydrolyse thermo-alcaline des BEM ; TOM = Traitement thermo-oxydant des BEM ; ALS = Hydrolyse alcaline des BES ; TAS = Hydrolyse thermo-alcaline des BES ; TOS = Traitement thermo-oxydant des BES.	161
Figure 22	Profils de la croissance cellulaire et de la sporulation de Btk HD-1 au cours de la fermentation de BES non traitées (Contrôle BES), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et de milieu synthétique conventionnel pour la production de Bt (SOJA).....	169
Figure 23	Suivi de l'oxygène dissous (OD) et du taux de transfert de l'oxygène ($k_L a$) au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et du milieu soja (SOJA).	171

Figure 24	Entomotoxicité et activité protéolytique de Btk HD-1 après 30h, 36h et 48h de fermentation de BES non traitées (Contrôle BES, 25 g MES/l), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et du milieu soja (SOJA). Les écarts types correspondent aux erreurs des méthodes, soit 7% et 7,7% pour l'entomotoxicité et l'activité protéolytique respectivement.	173
Figure 25	Suivi de la viscosité au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES) et de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant).	174
Figure 26	Suivi de la taille des particules au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES) et de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant). D50 = diamètre médian correspondant au diamètre équivalent pour lequel la valeur de la distribution cumulée est de 50 %.	175
Figure 27	Formation de mousse durant la fermentation de boues secondaires non hydrolysées par Btk HD-1 en fermenteur de 15 litres.	190
Figure 28	Entomotoxicité et ratio <i>Tx/prot.soluble</i> du surnageant de divers suspensions de Btk HD-1. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; TAM = Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes ; BES = Boues secondaires ; TAS = Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires.	195
Figure 29	Entomotoxicité et ratios <i>Tx/prot.soluble</i> et <i>Tx/spores</i> du culot de divers suspensions de Btk HD-1. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; TAM = Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes ; BES = Boues secondaires ; TAS = Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires.	196
Figure 30	Entomotoxicité spécifique des spores et des cristaux purifiés de Btk HD-1 produits dans différents substrats. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; BES = Boues secondaires.	197



LISTE DES ÉQUATIONS

- Équation 1 $dC_L / dt = k_1 a (C^* - C_L) - Q_{O_2} X$ 43
- Équation 2 $((\%mort.1:9/\%mort.std.1:9) + (\%mort.1:99/\%mort.std.1:99) + (\%mort.1:999/\%mort.std.1:999))/3 \times Entomotox.Foray = Entomotox.$ 71
- Équation 3 $m = (\log N_{t1} - \log N_{t2}) / (t_2 - t_1) = \mu \rightarrow \ln 2N_0 - \ln N_0 = \mu \times t_g \rightarrow \mu = 0,693 / t_g$ 72
- Équation 4 $C_L = C^* - 1/k_1 a \times (Q_{O_2} X + dC_L / dt)$ 72
- Équation 5 $dC_L / dt = -Q_{O_2} X$ 73
- Équation 6 $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$ 131
- Équation 7 $Y = 64480,97 + 839,34 * X_1 - 10285,96 * X_2 - 2744,91 * X_3 + 1438,28 * X_4 + 11,42 * X_1^2 + 21,99 * X_2^2 - 9,51 * X_3^2 + 3,58 * X_4^2 - 15,79 * X_1 * X_2 - 18,35 * X_1 * X_3 - 30,53 * X_1 * X_4 + 415,31 * X_2 * X_3 - 30,93 * X_2 * X_4 - 8,26 * X_3 * X_4$ 135
- Équation 8 $Y = -49335,95 + 685,70 * X_1 + 5820,63 * X_2 + 269,09 * X_3 - 115,73 * X_4 + 3,54 * X_1^2 - 360,05 * X_2^2 - 0,58 * X_3^2 - 4,83 * X_4^2 - 22,83 * X_1 * X_2 - 8,40 * X_1 * X_3 + 19,17 * X_1 * X_4 + 22,19 * X_2 * X_3 - 5,16 * X_2 * X_4 - 1,29 * X_3 * X_4$ 139
- Équation 9 $Y = 254241,74 - 1428,48 * X_1 - 3072,22 * X_2 - 2773,25 * X_3 - 362,29 * X_4 + 19,22 * X_1^2 - 75,77 * X_2^2 + 8,44 * X_3^2 + 1,01 * X_4^2 + 15,18 * X_1 * X_2 - 1,18 * X_1 * X_3 - 0,10 * X_1 * X_4 + 32,77 * X_2 * X_3 - 25,50 * X_2 * X_4 + 4,17 * X_3 * X_4$ 143
- Équation 10 $Y = -18316,61 - 44,59 * X_1 - 3420,82 * X_2 + 561,24 * X_3 + 537,87 * X_4 + 10,11 * X_1^2 + 456,91 * X_2^2 - 1,41 * X_3^2 + 0,19 * X_4^2 - 68,34 * X_1 * X_2 - 0,55 * X_1 * X_3 + 8,19 * X_1 * X_4 - 10,91 * X_2 * X_3 - 71,50 * X_2 * X_4 - 0,90 * X_3 * X_4$ 146
- Équation 11 $Y = -208233,15 - 271,30 * X_1 + 18620,09 * X_2 + 1261,34 * X_3 + 2228,87 * X_4 + 13,08 * X_1^2 - 345,50 * X_2^2 - 3,30 * X_3^2 - 1,40 * X_4^2 - 119,60 * X_1 * X_2 + 2,72 * X_1 * X_3 - 14,90 * X_1 * X_4 - 28,75 * X_2 * X_3 - 108,23 * X_2 * X_4 - 3,69 * X_3 * X_4$ 149



LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>Act.proteo.</i>	activité protéolytique
<i>Act.proteo./prot.solubles</i>	ratio de l'activité protéolytique pour un milligramme de protéines solubles (UI/mg)
AGV	acides gras volatiles
ANOVA	analyse de la variance
B	« billion of international units per U.S. gallon » ou milliard d'unités internationales par gallon américain
BEM	boues mixtes (ou épaissies) d'épuration des eaux usées primaires et secondaires
BES	boues secondaires d'épuration des eaux usées secondaires
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> sérovar <i>kurstaki</i>
Btk HD-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> sous-espèce <i>kurstaki</i> HD-1
COD	carbone organique dissous
COT	carbone organique total
cP	centipoise
CPI	cristaux protéiques insecticides
C _t	carbone total
DAP	pyridine-2 : acide 6 dicarboxylique ou acide dipicolinique
DBO	demande biologique en oxygène
DCO	demande chimique en oxygène
d.l.	degré de liberté
EDTA	éthylène-diamine-tetra-acétate
Entomotox.	entomotoxicité
É.-U.	Etats-Unis
F	valeur du test de Fisher
GTS	gélose tryptique soja
GVMRF	Guide de valorisation des matières résiduelles fertilisantes
h	heure
[H ₂ O ₂]	concentration de peroxyde d'hydrogène
INRS-ETE	Centre Eau, Terre et Environnement de l'INRS
<i>k_{La}</i>	coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène

ME	moyenne des écarts
MES	matière en suspension
MVES	matière volatile en suspension
min	minutes
MRS	méthodologie de réponse en surface
<i>n</i>	nombre total de valeurs observées
N-NH ₄ ⁺	azote ammoniacal
N _t	azote total
OD	oxygène dissous
<i>p</i>	probabilité associée à la valeur du test de Fisher ou de Student
PCC	plan composite centré
PEC	polymères extracellulaires
PHA	polyhydroxyalcanoates
PVA	produits à valeur ajoutée
PIV	protéines insecticides végétales
PMSM	fluorure de phénylméthylsulphonyl
P _t	phosphore total
<i>Q_{O₂X}</i>	taux de consommation de l'oxygène
R ²	coefficient de détermination
S	écart-type ou déviation standard de la valeur observée
SCF	Service canadien des forêts
SE	somme des écarts
ST	solides totaux
SVT	solides volatiles totaux
tbs	tonnes de boues sèches
temp.	température
<i>t</i>	valeur du test de Student
<i>Tx/prot.solubles</i>	ratio de l'entomotoxicité pour un milligramme de protéines solubles (UI/mg)
<i>Tx/spores</i>	ratio de l'entomotoxicité par 1x10 ³ spores (UI/1x10 ³ UFC)
UFC	unités formatrices de colonies
UI	unité internationale
S	écart type ou erreur standard d'un ensemble de données
σ ²	variance d'un ensemble de données
β	coefficient de régression

η	moyenne
μ	taux de croissance spécifique
α	distance axiale



GLOSSAIRE

Note: Cette section contient les définitions des termes en caractères gras dans le texte.

Analyse de la régression Méthode statistique avec laquelle il est possible de prévoir la valeur d'une variable en étudiant sa relation avec une ou plusieurs autres variables. Cette relation s'exprime au moyen d'une équation de régression (<http://www.statcan.ca>).

Analyse de la variance Méthode statistique qui examine les différences entre au moins deux moyennes de groupes de sujets afin de déterminer la pertinence de rejeter l'hypothèse que ces différences ne sont pas significatives (hypothèse nulle ou H_0). Elle fait appel au test de Fisher et aux valeurs de probabilité (p) associées. La variance (σ^2) est calculée avec le carré de la somme des déviations de chaque résultat (y_i) par rapport à la moyenne des résultats (η), divisée par le nombre total de résultats (n) (Box et al., 1976):

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \eta)^2 / (n)$$

À titre d'information, la racine carrée de la variance correspond à l'écart type ou l'erreur standard.

Biocontrôle Lutte envers les organismes nuisibles utilisant des agents de contrôle de nature biologique.

Bioconversion Processus impliquant des réactions organiques catalysées par des microorganismes pour former des produits biologiques (Demain et Davies, 1999). La communauté scientifique utilise parfois le terme « biotransformation » pour ce processus.

Boues d'épuration Dépôts, sédiments ou masses visqueuses qui sont produites lors du traitement des eaux usées.

Biosolides Tout produit solide organique issu de traitements privés, communautaires ou industriels des eaux usées qui respectent les critères applicables pour leur utilisation bénéfique, notamment comme amendement aux sols (USEPA, 1999). Les fumiers et les autres résidus de ferme sont généralement exclus des biosolides (Charbonneau et al., 2000). Depuis quelques années, le terme « biosolide » tend à remplacer le terme « boue d'épuration » afin d'amadouer le public souvent réticent sur les modes de gestion des boues d'épuration visant à les recycler et à les redistribuer dans l'environnement (Turkovsky, 2000).

Coefficient de détermination (R^2) Mesure de la variabilité de la réponse d'un modèle polynomial pouvant être expliquée par les facteurs expérimentaux et leurs interactions. Plus la valeur est proche

de 1, meilleur est la prédiction de la réponse par le modèle polynomial. La formule suivante permet de calculer le R^2 :

$$R^2 = 1 - (SE_{\text{résiduelle}}/SE_{\text{totale}})$$

Où $SE_{\text{résiduelle}}$ = somme des écarts résiduels, SE_{totale} = somme totale des écarts.

Coefficient de régression (β)

Indique la contribution de chaque variable indépendante lors de la prédiction de la réponse de la variable dépendante dans une équation de régression. Si le coefficient est positif, la relation entre la variable indépendante et la variable dépendante est positive. S'il est négatif ou égal à 0, la relation est négative ou nulle. Toutefois, ces valeurs dépendent des unités de mesure ou intervalles de chaque variable indépendante. Elles ne peuvent donc pas être comparées. Si les coefficients sont standardisés vers une moyenne de 0 et une déviation standard de 1, leur valeur permet de comparer la contribution relative (ou degré d'importance) de chaque variable indépendante lors de la prédiction de la réponse de la variable dépendante. Les coefficients sont standardisés lors de l'estimation des effets durant l'ANOVA (Statsoft, 2004).

Conditionnement

Procédé visant à faciliter le transport et l'entreposage des boues d'épuration stabilisées. Comprend les étapes de coagulation et de floculation des boues avant leur déshydratation mécanique.

Diauxie

Changement du métabolisme bactérien d'un substrat commun à un substrat moins commun durant lequel la synthèse des nouvelles enzymes se fait dans un bref délai. Ce phénomène survient lors de la culture des microorganismes en mode discontinu, particulièrement ceux dont le métabolisme est régulé par la répression catabolique.

Distance axiale

Distance entre les points étoiles et le point du centre dans un plan composite centré. Elle est représentée par le symbole α .

Effet linéaire

Différence entre la réponse moyenne de la variable dépendante aux niveaux inférieurs et supérieurs des variables indépendantes dans un modèle polynomial (Statsoft, 2004).

Effet quadratique

Différence entre la réponse moyenne au niveau du centre (niveau intermédiaire) et la combinaison des niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs respectifs dans un modèle polynomial (Statsoft, 2004).

Effet interactif

L'effet interactif de deux variables indépendantes sur la réponse de la variable dépendante est défini comme étant la moitié de la différence entre les principaux effets d'une variable indépendante aux deux niveaux de la seconde variable indépendante (Statsoft, 2004).

- Endospore** Forme cellulaire dormante qui est formée à l'intérieur de la cellule. Elle est unique aux bactéries. Le genre *Bacillus* se classe parmi les bactéries productrices d'endospores.
- Erreur de la méthode** Pourcentage de variation des résultats expérimentaux obtenus par une méthode dont le degré donne un aperçu de sa reproductibilité. Dans ce travail, l'erreur de la méthode a été mesurée avec la moyenne (η) et l'écart type des résultats (σ) de 30 essais individuels successifs sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec le même expérimentateur et durant le même jour. Sa formule est la suivante :
- $$\text{Erreur de la méthode (\%)} = (\eta/\sigma) \times 100$$
- Erreur pure** Variabilité de l'erreur associée aux incertitudes lors de la mesure de la variable dépendante. Elle est estimée lors de la réplication des expériences du plan expérimental. Cette variabilité donne une indication sur l'erreur attribuée au hasard lors des mesures de la variable dépendante et associée à des facteurs non contrôlés ou/et à la fiabilité des instruments de mesure. Comme les expériences répliquées sont réalisées sous les mêmes conditions, l'estimation de la variabilité de l'erreur est indépendante des effets linéaires et quadratiques ainsi que des interactions contenus dans le modèle polynomial. Elle peut être utilisée pour tester la signifiante de la variance résiduelle, soit toutes les variabilités restantes qui ne peuvent pas être considérées par les facteurs et leurs interactions dans le modèle polynomial. Si la variabilité résiduelle est significativement plus grande que l'erreur pure, il est possible de conclure qu'il reste quelques variabilités significatives attribuées aux différences entre les groupes et que le modèle n'est pas convenable pour prédire adéquatement la réponse.
- Estimation des effets** Estimation des déviations de la moyenne des niveaux inférieurs par rapport à la moyenne des niveaux supérieurs de chaque variable indépendante. Par exemple, si la température de l'hydrolyse passe de 120°C à 180°C, le modèle prévoit une amélioration ou une diminution égale à l'estimation de l'effet. En d'autres mots, l'estimation des effets indique le degré d'importance de chaque composante du modèle sur la réponse de la variable dépendante. Des coefficients de régression dits « standardisés » peuvent être calculés à partir de l'estimation des effets (voir définition de « coefficients de régression »). Ces coefficients correspondent à la moitié de la valeur de l'estimation. Ils ne peuvent pas être utilisés pour prédire la réponse de la variable dépendante (Statsoft, 2004).
- Fermentation** Dans le secteur des biotransformations, ce terme signifie la culture des microorganismes (Demain et Davies, 1999).
- Intervalle de confiance** Intervalle de valeurs autour de la ligne de régression dans laquelle la vraie valeur (de la variable dépendante selon les valeurs attribuées aux variables indépendantes) peut se situer selon un degré de certitude donné (ex. : 95%) (Statsoft, 2004).

Intervalle de prédiction Intervalle de valeurs autour de la ligne de régression dans laquelle une observation additionnelle de la variable dépendante peut se situer selon un degré de certitude donné (Statsoft, 2004).

Justesse Étroitesse de l'accord, à un niveau donné dans la zone de quantification de la méthode, entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen obtenu en appliquant le procédé expérimental un grand nombre de fois (MEF, 1995).

Manque d'ajustement Expression pour décrire un modèle qui n'intègre pas de façon adéquate les données expérimentales. Il est déterminé avec l'erreur pure et la variabilité résiduelle. Normalement, la variabilité résiduelle d'un modèle « convenable » pour prédire la réponse de la variable dépendante doit être approximativement égale à la variabilité de l'erreur des expériences répliquées (erreur pure). Si la variabilité résiduelle est significativement plus grande, la réponse est affectée par des variables qui sont exclues du modèle.

Matières putrescibles Toute matière apte à être dégradée par voie biologique.

Matières résiduelles Toute matière ou objet périmé, rebuté ou autrement rejeté par les ménages, les industries, les commerces et les institutions, à l'exception des matières dangereuses générées par les industries, les commerces et les institutions, des déchets biomédicaux et des résidus de pâtes et papiers (MEF, 1998).

Milieu non newtonien Fluide dont le stress de cisaillement n'est pas proportionnel à la vitesse du gradient qui est perpendiculaire au plan du cisaillement (<http://en.wikipedia.org>).

Modèle de régression Modèle statistique utilisé pour décrire la relation entre une variable dépendante et une ou plusieurs variables indépendantes. Ces modèles présentent des formes et des degrés de complexité très divers (<http://www.statcan.ca>).

Moyenne des écarts Variance causée par la variabilité inter-groupe ($ME_{\text{modèle}}$) et/ou variance causée par la variabilité au sein d'un groupe ($ME_{\text{résiduelle}}$). Le test de Fisher utilise la moyenne des écarts (ME) lors de l'analyse de la variance (<http://www.statcan.ca>).

$$ME_{\text{modèle}} = SE_{\text{modèle}}/k$$

$$ME_{\text{résiduelle}} = SE_{\text{résiduelle}} / (n - k - 1)$$

Où $SE_{\text{modèle}}$ = somme des écarts du modèle, $SE_{\text{résiduelle}}$ = somme des écarts résiduels, k = nombre de variables indépendantes, n = nombre d'expériences.

Probabilité (p) Indice de fiabilité d'un résultat, probabilité de l'erreur impliquée lorsque le résultat observé est considéré valide (ou représentatif de la population). La valeur p est normalement utilisée pour déterminer la signification statistique d'un résultat (Statsoft, 2004). Une faible valeur p suggère que l'effet ou le coefficient émette un fort signal en comparaison avec le bruit de fond et qu'il est trop grand pour être obtenu seulement

par hasard. Par exemple, si $p < 0,05$, l'effet est marginalement significatif. Cela correspond aussi à un niveau de confiance de 95% pour le test de l'hypothèse H_0 où les effets (ou les coefficients) seraient égaux à 0.

Produits à base biologique Produits chimiques ou biologiques fabriqués par des procédés impliquant des processus biologiques (microorganismes, enzymes...).

Répression catabolique Mécanisme régulateur qui assure l'utilisation organisationnelle et séquentielle des sources de carbone, d'azote et de phosphore lorsque plusieurs sources sont présentes dans le milieu. Normalement, le microorganisme catabolise la meilleure source présente, soit celle qui fournit le plus rapidement du carbone, de l'azote, du phosphore et de l'énergie pour la croissance. Simultanément, la synthèse des enzymes utilisés pour cataboliser les autres substrats ou produire des métabolites secondaires est réprimée jusqu'à ce que la meilleure source soit entièrement consommée (Sanchez et Demain, 2002). Le glucose et d'autres sources de carbone simples (maltose, glycérol...) peuvent réprimer plusieurs opérons chez les bactéries Gram positives et négatives. La transcription du gène cible est empêchée par une protéine de répression qui se lie au site opérateur sur l'ADN promoteur (Banerjee-Bhatnagar, 1998). Les sources d'azote simples ($N-NH_4^+$, glutamine, asparagine...) et de phosphore inorganique peuvent aussi provoquer la répression catabolique. L'absence ou la faible concentration des sources simples de C, N et P atténue l'effet de la répression catabolique sur la production de métabolites secondaires (enzymes spécifiques, antibiotiques...). La répression catabolique se classe parmi deux autres types de régulation métabolique, soit l'induction (inducteur empêchant un répresseur de fonctionner) et la rétroaction (régulation de l'activité des enzymes déjà formées et arrêt de leur synthèse par les produits fabriqués) (Sanchez et Demain, 2002).

Stabilisation Procédés conduisant à la transformation des polluants initialement présents dans les boues d'épuration des eaux usées (pathogènes, métaux, odeurs...) en des composés plus stables et à leur immobilisation dans la matrice.

Somme des écarts Mesure utilisée lors de l'analyse de la variance (ANOVA) pour évaluer la signification statistique du modèle. Lorsqu'il y a plusieurs valeurs observées pour une composante du modèle, l'ANOVA calcule la moyenne et la variance de chaque composante. À partir de ces données, la variation totale ou la somme totale des écarts (SE_{total}) est mesurée. Cette dernière est divisée en deux parties, soit la variation expliquée par le modèle ($SE_{modèle}$) et la variation inexpliquée ($SE_{résiduelle}$). La $SE_{modèle}$ est causée par les différences entre les moyennes des groupes d'échantillons (ou des composantes). La $SE_{résiduelle}$ se divise en deux sources de variabilité inexpliquée, soit le manque d'ajustement et l'erreur pure. La $SE_{modèle}$ et la $SE_{résiduelle}$ sont nécessaires pour calculer les moyennes des écarts du modèle ($ME_{modèle}$) et résiduelles ($ME_{résiduelle}$) qui sont requises pour juger la signification du modèle avec un test de Fisher. À titre d'information, la

$SE_{\text{modèle}}$, la $SE_{\text{résiduelle}}$, le manque d'ajustement et l'erreur pure correspondent respectivement aux « SS effect », « SS error », « lack of fit » et « pure error » dans le logiciel STATISTICA de Statsoft Inc. (Thulsa, É.-U.). Les formules pour calculer la SE_{totale} , la $SE_{\text{modèle}}$ et la $SE_{\text{résiduelle}}$ et leurs degrés de liberté (d.l.) associés sont:

$$SE_{\text{totale}} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \quad \text{d.l.} = n - 1$$

$$SE_{\text{modèle}} = \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad \text{d.l.} = k$$

$$SE_{\text{résiduelle}} = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad \text{d.l.} = n - k - 1$$

Où k = nombre de variables indépendantes, Y_i = réponse de la variable dépendante ou valeur observée pour une expérience, \bar{Y} = moyenne des valeurs observées de la variable dépendante, \hat{Y}_i = valeur prédite de la réponse de la variable dépendante.

Test de Fisher (F)

Mesure de la variation de la donnée vis-à-vis la moyenne. Généralement, la valeur du test de Fisher (F) devrait être plusieurs fois supérieure à la valeur de la donnée si le modèle permet de bien prédire les résultats expérimentaux et si les effets estimés des facteurs sont fiables. Les formules pour calculer la valeur F d'une composante ($F_{\text{composante}}$) ou du modèle ($F_{\text{modèle}}$) sont les suivantes :

$$F_{\text{composante}} = ME_{\text{composante}} / ME_{\text{résiduelle}}$$

$$F_{\text{modèle}} = ME_{\text{modèle}} / ME_{\text{résiduelle}}$$

Test de Student (t)

Différence du coefficient en relation avec son erreur standard (ou écart type). Elle est obtenue en divisant chaque coefficient par son erreur standard.

Valeur observée

Valeur expérimentale de la variable dépendante.

Valeurs optimales provisoires

Valeurs initiales des variables expérimentales de chaque traitement pour entamer l'optimisation.

Valeur prédite

Valeur de la variable dépendante prédite par le modèle de régression.

Valeur propre

Les valeurs propres des effets de second ordre représentent la courbure de la réponse quadratique en surface. Les valeurs propres sont positives lorsque la réponse en surface est ascendante à partir d'un minimum et sont négatives si la réponse en surface est descendante à partir d'un maximum. Les valeurs propres positives et négatives indiquent que la surface a une forme de selle, déviant de façon ascendante dans une direction et de façon descendante dans l'autre (Statsoft, 2004).

Valeur résiduelle

Valeur représentant la déviation d'une valeur expérimentale (ou valeur observée) par rapport à la ligne de régression (ou valeur prédite). Il s'agit de la différence entre la valeur observée et la valeur prédite.

Vecteur propre

Les vecteurs propres montrent l'orientation de la courbure de la réponse quadratique en surface. Les vecteurs propres et les valeurs propres correspondantes informent sur la courbure (ascendante ou descendante) ou l'absence de courbure de la réponse quadratique en surface dans chaque direction définie par les variables indépendantes (Statsoft, 2004).

Viscosité

Propriété d'un fluide qui se caractérise, à première vue, comme un fluide dense et épais qui résiste au versement. Il s'agit plus précisément de la résistance interne d'un fluide et elle peut être interprétée comme la friction d'un fluide (<http://en.wikipedia.org>).



INTRODUCTION

Le développement démographique et la mondialisation croissante de l'économie provoquent une augmentation marquée de la consommation des biens et des services, ce qui génère inévitablement des quantités abondantes de **matières résiduelles** dont il faut disposer de façon sécuritaire et économique. Certaines de ces matières résiduelles sont récupérables alors que d'autres sont des résidus difficilement valorisables à cause de leur nature, de l'absence de technologies de valorisation ou de la carence de marchés potentiels. Cependant, en intégrant la production de produits à valeur ajoutée (PVA) comme une méthode économique pour valoriser ces résidus, les percées commerciales et les gains financiers escomptables permettraient de réduire considérablement les coûts de gestion. Les boues d'épuration des eaux usées sont un exemple de matière résiduelle dont le potentiel économique est sous-estimé. Reconnus pour leur potentiel fertilisant et souvent éliminés par épandage, il est possible d'aller au-delà de cette pratique et d'opter pour la production de PVA. Elles ont la capacité d'être une matière première abondante, économique et porteuse de caractéristiques nutritives stimulantes pour l'obtention de produits microbiens. En fait, les boues d'épuration ont un potentiel nutritif capable de supporter la croissance de différents microorganismes producteurs de PVA comme par exemple des bioplastiques ou des bio-gaz. En exploitant au maximum le potentiel nutritif des biosolides, les procédés de production de PVA deviennent plus performants et par conséquent plus rentables.

Dans cette perspective, l'équipe de recherche du professeur R.D. Tyagi du Centre Eau, Terre et Environnement de l'Institut national de la recherche scientifique (INRS-ETE, Québec) a développé un bioprocédé innovateur pour mettre en valeur les boues d'épuration. Ce bioprocédé, appelé temporairement « procédé BT-INRS », utilise les boues d'épuration des eaux usées comme matière première économique pour la production d'un bio-insecticide (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1). Cette nouvelle approche permet de minimiser le problème des boues d'épuration tout en produisant un bio-insecticide à coût moindre qui favorisera la lutte biologique contre les organismes nuisibles dans les secteurs forestiers et agricoles. Cependant, avant sa mise à l'échelle et sa commercialisation, ce bioprocédé doit être optimisé afin de fournir un bio-insecticide capable de rivaliser sur le marché des pesticides. Le présent projet vise donc à développer une stratégie pour améliorer le rendement du procédé BT-INRS en termes d'entomotoxicité, de cellules et de spores produites ainsi que d'activité protéolytique. L'accent est mis sur une stratégie qui peut améliorer non seulement le procédé BT-INRS, mais aussi tous les futurs bioprocédés qui utiliseront

les boues d'épuration comme substrat de base pour la production de PVA (bio-fongicides, bio-herbicides, bio-inoculants, enzymes, bio-plastiques, etc.). Comme le procédé BT-INRS consiste en une **fermentation** des boues, le potentiel nutritif et la rhéologie du milieu de culture sont très importantes pour la croissance microbienne. La stratégie proposée est la solubilisation partielle des boues en vue d'améliorer leurs caractéristiques nutritives et rhéologiques, ce qui permettra d'accroître le nombre de cellules microbiennes et de les stimuler à produire une grande quantité de PVA. Ce projet fera du procédé BT-INRS un exemple préminent dans le secteur de l'industrie de l'environnement, créera une nouvelle filière de valorisation dans la gestion des matières résiduelles, instaurera une nouvelle avenue en gestion des ressources et inaugurerà une bio-industrie basée sur des matériaux économiquement viables.

Le contenu de ce document se divise en sept chapitres. Le premier chapitre présente les problématiques économiques et environnementales auxquelles la société est actuellement confrontée et décrit comment le procédé BT-INRS permettra de les résoudre. Il est aussi question dans ce chapitre des obstacles à surmonter pour que le procédé BT-INRS puisse fournir un meilleur bio-insecticide et connaître un succès commercial sur le marché des pesticides. Une revue de littérature sur *Bacillus thuringiensis* et l'hydrolyse des boues est présentée dans le deuxième chapitre pour justifier les hypothèses et les objectifs de recherche décrits dans le troisième chapitre. Le quatrième chapitre décrit la méthodologie utilisée. Les derniers chapitres présentent les résultats obtenus et leur interprétation. Le document se termine avec des conclusions et des recommandations.

CHAPITRE 1: BIOCONVERSION DES BOUES D'ÉPURATION EN BIOPESTICIDE

Ce premier chapitre décrit la problématique concernant l'utilisation des ressources et la production coûteuse de produits à base biologique. La production des biopesticides est citée en exemple et l'utilisation des boues d'épuration comme substrat de base est la solution proposée pour diminuer les coûts de production. Quelques aspects importants du procédé BT-INRS sont ensuite énumérés afin de sensibiliser le lecteur aux deux facteurs qui limitent son rendement et qui n'ont pas fait l'objet d'études antérieures.

1.1 Contexte environnemental et socio-économique

1.1.1 L'épuisement des ressources

Au cours des vingt dernières années, la société est confrontée à l'épuisement progressif des réserves en combustibles fossiles. Les autorités gouvernementales anticipent des problèmes d'approvisionnement et financent des programmes de recherche visant l'exploitation énergétique de matières premières renouvelables, telles les biomasses agricoles (maïs, blé, canola, soja...) et forestières (matières lignocellulosiques). Ces programmes ont permis d'élaborer de nouvelles technologies de transformation et de développer des **produits à base biologique** qui débouchent sur de nouveaux marchés comme ceux de la bio-énergie (ex. : la gazéification de la biomasse en électricité ou en biogaz), des biocombustibles (ex. : la production de bio-diesel et d'éthanol) et des plastiques biodégradables (polylactate, polyhydroxyalcanoates ou PHAs...). Ces nouvelles bio-productions permettraient d'alléger la demande pour les combustibles fossiles. Par rapport à leurs homologues chimiques, les produits à base biologique ont un intérêt environnemental convoité : biodégradables, action spécifique, toxicité moindre et faible consommation en énergie¹. D'autres bio-productions sont envisagées : produits industriels (acides organiques, enzymes, bio-surfactants...), agents de biocontrôle (bio-insecticides, bioherbicides, biofongicides...), fertilisants et autres constituants de certains textiles, adhésifs, matériaux composites ou cosmétiques.

¹ Par exemple, certaines enzymes peuvent exiger de plus faibles températures pour fonctionner contrairement à des produits chimiques dont les réactions surviennent à températures plus élevées.

Plusieurs pays, dont les États-Unis, ont mis à la disposition du public une documentation importante sur la recherche, le développement et les orientations dans les secteurs de la bio-production (NBPBCO, 2001a et b ; OIT, 1999a et b). De son côté, le gouvernement canadien a publié un document qui résume bien les tendances américaines et européennes dans le secteur de la bio-énergie et des bio-carburants. Ce document recommande des stratégies pour que le pays puisse rivaliser et redevenir un chef de file en matière de développement de la bio-énergie et des bio-produits (AGCan et CCNUPA, 2001). Cependant, cette approche précipitée de la substitution du carburant fossile par des matières premières renouvelables, particulièrement celles qui utilisent des sols agricoles comme base de production, porte flanc à la critique et certains considèrent qu'elle n'obéit pas aux principes du développement durable. Elle entraînerait une surproduction agricole qui détournerait des ressources importantes de leur finalité nourricière vers les productions d'énergie. Cela provoquerait une surchauffe de l'ensemble des systèmes de production, contribuant davantage à la raréfaction des ressources, à la dégradation des sols et des ressources aquatiques, à la montée des prix des biomasses et à la dégradation générale de la qualité de la vie (Barnabé et al., 2003; Van Wyk, 2002; Gerngross, 1999). De plus, les produits à base biologique issus de biomasses renouvelables se butent à des coûts de production élevés qui affectent leur diffusion dans la société². Outre la bio-énergie et les biocombustibles, les marchés des produits à base biologique sont peu développés car l'offre est faible et la domination des produits chimiques décourage les entreprises et les investisseurs. Les coûts de production élevés dépendent largement des coûts de la matière première (approvisionnement, traitement) et de l'exploitation de procédé de conversion ainsi que, s'il y a lieu, de l'extraction et de la formulation du produit final (Dale, 1999 ; NRC, 1999).

Pour minimiser l'exploitation des ressources renouvelables et diminuer les coûts de production des produits à base biologique, la recherche d'une matière première bon marché est l'une des solutions

² À titre d'exemple, Gerngross (1999) a estimé qu'un procédé de fabrication des PHAs à partir du maïs consomme 22% plus de vapeur, 19 fois plus d'électricité et 7 fois plus d'eau qu'un procédé conventionnel pour produire du polystyrène à partir de l'huile fossile. Les PHAs ont des caractéristiques similaires au polystyrène. Les procédés de fabrication des PHAs sont généralement des fermentations aérobies exigeant de fortes aérations et agitations, un contrôle de température adéquat et plusieurs étapes en aval (bris des cellules, centrifugation, lavage et séchage) qui requièrent l'énergie de combustion des ressources fossiles (gaz, huile et charbon). Selon l'analyse de Gerngross, en terme de consommation d'énergie et d'émission de gaz à effet de serre, la production des PHAs à partir des biomasses agricoles n'est pas plus viable que les procédés pétrochimiques conventionnels pour produire des plastiques : la quantité de combustibles fossiles (2,39 kg) nécessaire pour produire 1 kg de PHAs excède celle (2,26 kg) pour produire la quantité équivalente de polystyrène. De plus, les émissions sont alarmantes : la fabrication de PHAs requière la combustion complète du 2,39 kg pour la production d'énergie alors que la fabrication du polystyrène brûle seulement 0,48 kg du 2,26 kg, la balance étant utilisée comme matière première. De plus, 3,33 kg de glucose (maïs), 149 g de sels minéraux et 26 L d'eau sont requis pour fabriquer 1 kg de PHAs, comparativement à 1,78 kg de combustibles fossiles, 20 g de sels minéraux et 4 L d'eau pour le polystyrène. La consommation en matière première pour produire des PHAs est beaucoup plus élevée. Finalement, cette consommation a un impact sur le prix : les PHAs coûtent 4 à 16 US\$ par kilogramme alors que le polystyrène est vendu à 1 US\$.

préconisées par les autorités environnementales et les industries concernées. La communauté scientifique prend part à cette recherche et propose des eaux usées et des biomasses résiduelles des industries agro-alimentaires et forestières comme source d'approvisionnement alternative et économique (Montgomery, 2004 ; Laufenberg et al., 2003 ; Perlack et Turhollow, 2003 ; Gallert et Winter, 2002 ; Lora et Glasser, 2002; Van Wyk, 2001 et 2002 ; Kaylen et al., 2000 ; Pandey et Soccol, 2000 ; Schügerl, 1994). Barnabé et al. (2003) ont répertorié des études spécifiques sur la **bioconversion** d'eaux usées et de biomasses résiduelles provenant de différentes industries (laitière, brassicole, transformation de pommes de terre, pâtes et papiers) en plusieurs produits à base biologique (protéines pour l'alimentation animale, acides organiques, éthanol, bio-surfactants, bioplastiques, enzymes, agents de biocontrôle). Les connaissances sur la bioconversion des biomasses résiduelles se développent rapidement et culmineront bientôt vers une industrie de produits à base biologique basée sur des matériaux économiquement viables.

1.1.2 Les boues d'épuration : source d'approvisionnement alternative ?

La population croît constamment et le besoin incessant de consommation réduit considérablement les ressources terrestres avec lesquelles la société s'approvisionne depuis des siècles. Le résultat de leur exploitation est une masse de déchets dont la gestion s'avère une problématique pour plusieurs pays. Pour résoudre le problème, certains chercheront à réduire le degré de consommation alors que d'autres exploiteront de nouvelles ressources. Les plus perspicaces envisagent les déchets comme une source d'approvisionnement pour les produits que la société consomme. Il est question ici des déchets pouvant être mis en valeur selon les technologies de transformation actuellement disponibles, notamment les matières résiduelles de nature organique comme les **boues d'épuration** des eaux usées.

Les types de **matières résiduelles** incluent la catégorie des **matières putrescibles** dans laquelle se situent les boues d'épuration produites lors du traitement des eaux usées. Les boues sont soit d'origines municipale (réseaux d'égouts), industrielle (ex. : pâtes et papiers) ou agricole (ex. : boues biologiques issues du traitement du lisier de porc). Dans ce travail, il est question des boues d'origine municipale.

La production totale de boues dans les stations d'épuration municipales au Québec se situe à l'heure actuelle aux environs de 200 000 tbs/an. Elles sont enfouies, incinérées, compostées ou valorisées par épandage (Charbonneau et al., 2000). En plus de faire face à des contraintes environnementales et des coûts sociaux importants, l'enfouissement et l'incinération éliminent des

matières qui pourraient être utilisés à des fins bénéfiques³. Dans la conjoncture actuelle, le coût de l'énergie, la volonté de recycler ou de récupérer au mieux les produits considérés comme des déchets, l'évolution de la réglementation en matière de protection de l'environnement et l'innovation technologique favorisent la mise en valeur des boues. La production de bio-énergie par digestion anaérobie, l'épandage agricole et la restauration des sites dégradés sont des méthodes de valorisation privilégiées. Ces pratiques bien établies mettent en évidence le potentiel « nutritif » des boues. Elles sont effectivement d'excellentes sources de C, N et P pour la végétation et les microorganismes du sol (épandage agricole, réhabilitation des sites) ainsi que pour les microorganismes endogènes des boues d'épuration (production de bio-gaz).

En explorant le potentiel nutritif des boues d'épuration municipales, elles s'avèrent une source potentielle d'approvisionnement pour la fabrication de produits à base biologique ou de produits à valeur ajoutée (PVA). Si les boues devenaient des intrants de l'industrie des produits à base biologique, elles auraient les avantages suivants par rapport aux matières premières conventionnelles : (i) disponibilité continue du substrat, sans contrainte saisonnière ; (ii) coûts d'approvisionnement très faibles et contrôlables ; (iii) valeur nutritive intrinsèque riche et diversifiée dont la biochimie est peu connue, mais apparemment performant dans la production de certains produits microbiens ; (iv) variété de souches microbiennes autochtones et exploitables ; (v) accessible aux pays industrialisés et sous-développés et favorable à l'expansion industrielle. À l'heure actuelle, la production de PVA en utilisant les boues d'épuration municipales se limite à des fertilisants (composts, boues déshydratées) et des bio-gaz (méthane, hydrogène). La communauté scientifique et les municipalités ne perçoivent toujours pas les boues d'épuration municipales comme une source d'approvisionnement alternative pour la production de PVA d'intérêt commercial⁴. Les risques technologiques quant à la commercialisation de PVA issus de boues municipales expliquent le peu d'intérêt vis-à-vis ce type de bio-production. La composition

³ En 1998, approximativement 66000 tonnes étaient valorisées par épandage ou compostées, soit 33% des boues produites (Charbonneau et al., 2000). L'enfouissement est de moins en moins pratiquée : la réduction du nombre de sites appropriés, les hausses des taxes d'enfouissement, les inquiétudes du public vis-à-vis la contamination potentielle des eaux de surface et souterraines par les pathogènes, métaux lourds et composés organiques toxiques et les pressions des autorités environnementales découragent les producteurs de boues à opter pour cette forme d'élimination. L'incinération est de plus en plus pratiquée en raison des moyens développés pour éliminer les cendres de façon sécuritaire et traiter convenablement l'air contaminé par les fumées. Cependant, elle est toujours aussi onéreuse et détruit une matière qui peut être utilisée à d'autres fins (Campbell, 2000). Les autorités concernées par le développement durable encouragent la diversification des filières de valorisation, notamment celles produisant un maximum de valeur ajoutée.

⁴ Selon la littérature consultée, très peu de chercheurs s'aventurent dans cette direction. Midilli et al. (2002) ont étudié la production d'hydrogène à partir de boues municipales. Odegaard et al. (2002) ont décrit un concept de mise en valeur des boues municipales qui suggère de les utiliser pour fabriquer des produits d'intérêt commercial (biogaz, sources de nutriments pour les procédés biologiques et coagulants pour métaux). Molla et al. (2002) ont réalisé des travaux sur la bioconversion des boues municipales par des champignons pour produire du compost.

variable des boues d'épuration, la présence de contaminants (pathogènes, virus, métaux traces, composés organiques toxiques) et la formation de mousse durant la bioconversion sont des exemples de risques technologiques qui sèment l'inquiétude chez les potentiels investisseurs et qui constituent un défi pour les biotechnologistes. Cependant, il est possible de minimiser les risques technologiques en effectuant les bons choix : les PVA à produire, les boues d'épuration à transformer, les technologies de traitement en amont des boues d'épuration (si nécessaire), de bioconversion (ex. : mode de culture, microorganismes) et d'extraction (récupération et/ou purification) des produits désirés ainsi que des marchés à intégrer⁵.

1.1.3 Les pesticides : marchés à conquérir pour la bio-industrie émergente

Soucieuse de son économie, la société tend à utiliser les ressources les moins coûteuses sans se préoccuper des conséquences sur l'environnement. Lorsque le choix se présente, le moyen chimique est utilisé au détriment du moyen biologique nettement plus sécuritaire pour l'environnement. Le coût élevé du moyen biologique, le peu d'information à son sujet, ses mythes à propos des bio-hasards qu'il peut provoquer, etc. ne suscitent pas l'intérêt des individus, des industries et des investisseurs privés. C'est le cas notamment pour le secteur du contrôle des organismes nuisibles. Les statistiques indiquent que 99% des pesticides utilisés à travers le monde sont chimiques pour un marché global de 32 milliards en dollar américain (Marrone, 1999). L'efficacité, le coût et l'aspect pratique des pesticides chimiques favorisent leur vente auprès des pays industrialisés ou sous-développés et les particuliers comme les éleveurs porcins et les agriculteurs. Malgré leur efficacité et leur faible coût, l'utilisation des pesticides chimiques pour le contrôle des organismes nuisibles a plusieurs désavantages : non biodégradables, ils contaminent les eaux de surface, les sols et les eaux souterraines ; non spécifiques, ils affectent plusieurs organismes nuisibles et non nuisibles à la fois, bouleversent les écosystèmes et sélectionnent rapidement les organismes résistants. De leur côté, les biopesticides sont biodégradables, très spécifiques à des organismes nuisibles cibles, sans danger pour les plantes, les animaux ainsi que les humains et sont une excellente alternative pour combattre les organismes nuisibles devenus résistants aux pesticides chimiques. L'augmentation continue de la résistance des organismes

⁵ Pour plus d'information au sujet des choix stratégiques quant à la production de PVA en utilisant les eaux usées, les boues d'épuration et les biomasses résiduelles comme substrat de base, le lecteur est invité à consulter l'article de Barnabé et al. (2003) et le résumé d'une conférence réalisée en mars 2004 au Salon des Technologies Environnementales au Palais des Congrès de Québec (Barnabé et al., 2004). Ces deux documents sont disponibles à l'Annexe 1.

nuisibles et les inquiétudes sociales sur la contamination des écosystèmes affectent considérablement le marché des pesticides chimiques. De plus, peu de pesticides chimiques ont été enregistrés dans la dernière décennie à cause du marché très compétitif ainsi que du coût et du temps nécessaires à la découverte et à l'enregistrement de nouveaux ingrédients actifs. Les ventes augmentent seulement de 2% par année contrairement à une forte augmentation de 10 à 15% par année pour les bio-pesticides (Neale, 2000)⁶. Le marché mondial des pesticides est maintenant très ouvert aux biopesticides. Les industries et les investisseurs doivent saisir cette opportunité et produire des biopesticides à coût moindre capables de rivaliser avec les pesticides chimiques. Comme les coûts de production des biopesticides sont généralement élevés à cause des milieux synthétiques dispendieux utilisés pour les produire, l'utilisation de milieux alternatifs peu coûteux est une solution étudiée par plusieurs organismes ou instituts travaillant sur le **biocontrôle**. Il s'agit donc d'un marché très intéressant pour des PVA produits à partir des boues d'épuration municipales. De plus, les rendements de production et les coûts de la configuration des biopesticides pour le marché ciblé influencent aussi leur coût total de production (Lisansky, 1999 et 2000). Il y a donc intérêt à trouver une matière première économique, capable d'accroître les rendements de production et de minimiser les coûts de configuration.

Dans cette prospective, un procédé de bioconversion des boues d'épuration municipales en bio-insecticide à base de *Bacillus thuringiensis* a été proposé par le professeur R.D. Tyagi de l'INRS-ETE et le Dr J.R. Valéro de Ressources naturelles Canada : il s'agit du procédé appelé temporairement « procédé BT-INRS ».

1.2 Procédé BT-INRS

Le procédé BT-INRS fait l'objet d'intenses recherches à l'INRS-ETE depuis plusieurs années. Il consiste à utiliser les boues d'épuration municipales comme substrat de fermentation pour produire un insecticide biologique à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Quelques souches bactériennes de Bt sont entomopathogènes et accaparent une importante part du marché dans le secteur du biocontrôle. Les souches en question sont généralement utilisées pour contrôler les insectes nuisibles comme certaines larves de lépidoptères (ex.: tordeuse des bourgeons de l'épinette ou

⁶ En 1998, le marché des bio-pesticides était évalué à plus de 350 millions en dollar américain (Copping et Menn, 2000). Les bio-pesticides microbiens (bactérie, virus, champignon, toxines, antibiotiques) sont les plus importants en biotechnologie environnementale avec des ventes de 150 millions en dollar américain (Marrone, 1999).

pomme de terre). Ce type de bio-insecticide rivalise depuis des années avec les insecticides chimiques. Les préparations commerciales de Bt contiennent généralement des spores et des cristaux protéiques insecticides (CPI). La souche bactérienne produite par le procédé BT-INRS est la souche HD-1 du sérovar *kurstaki* de *Bacillus thuringiensis* (Btk HD-1). Cette souche est utilisée notamment pour la lutte biologique contre les larves de la TBE. Les spores et les CPI sont généralement produits dans un milieu synthétique à base de soja, de glucose et des sels minéraux qui, à grande échelle, sont des ingrédients dispendieux. Le procédé BT-INRS se distingue des procédés conventionnels en utilisant les boues d'épuration municipales qui supportent très bien la croissance, la sporulation et la production des toxines insecticides de Bt (Tirado-Montiel, 1997).

Le procédé BT-INRS a aussi un second produit qui fait l'objet de plusieurs études (Tyagi et al., 2002 ; Lamontagne, 2004 ; Yezza, 2004). Il s'agit des protéases alcalines produites par Btk lors de la fermentation. Ces protéases peuvent être récoltées et vendues à des marchés importants comme celui des détergents.

Une fois commercialisé, ce procédé aura des retombées économiques et sociales très importantes à l'échelle nationale et internationale :

- **La production de souches entomopathogènes de Bt à coût moindre** : La production de bio-insecticide à base de Bt est coûteuse et nécessite un substrat de fermentation abordable et accessible pour favoriser la compétition avec les insecticides chimiques dans les secteurs agricoles à l'échelle mondiale. Le prix du milieu de culture dans les procédés conventionnels de production de Bt correspond entre 35% et 59% du coût total de production (Lisansky et al., 1993). En utilisant les boues d'épuration comme milieu de culture alternatif, les coûts de production de Bt seraient réduits de plus de 50%. En plus d'utiliser une matière première alternative à coût nul, les meilleurs rendements de production dans les boues contribuent à diminuer le coût total de production ⁷ ;
- **Réduction du coût de gestion des boues** : Le procédé BT-INRS minimise la quantité de boues d'épuration à gérer et s'intègre très bien dans une chaîne de traitement des eaux usées où des

⁷ Effectivement, il est possible d'envisager des réductions de coûts associées aux meilleurs rendements de production (voir section 1.2.1) car c'est un facteur important pour les analyses technico-économiques. De plus, d'autres réductions de coûts sont envisagées en considérant le coût négatif des boues, c'est-à-dire les économies faites par le producteur de boues suite à la diminution de la quantité de boues à gérer. Finalement, les réductions sont probants si les économies liées à la diminution potentielle des coûts de configuration du produit sont considérées. Selon Brar (2004), les caractéristiques physico-chimiques des boues font que le produit final requière moins de modifications et d'additifs pour répondre aux exigences des marchés ciblés.

- **Réduction du coût de gestion des boues** : Le procédé BT-INRS minimise la quantité de boues d'épuration à gérer et s'intègre très bien dans une chaîne de traitement des eaux usées où des boues sont souvent réutilisées (ex. : production de méthane). Le procédé BT-INRS prévient des dépenses importantes en réutilisant une partie des boues qui serait autrement éliminée. De plus, les coûts de gestion sont davantage réduits par des revenus obtenus avec la vente de PVA ;
- **Un apport à l'industrie forestière canadienne** : Pour protéger leurs forêts et conserver leur position mondiale dans le secteur forestier, le Québec et le Canada doivent se doter de technologies économiques pour la lutte biologique (obligatoire) contre les insectes ravageurs. Le procédé BT-INRS est une nouvelle technologie applicable en foresterie capable d'intervenir vis-à-vis la situation préoccupante des forêts canadiennes. À l'heure actuelle, il n'y a aucune usine de production de Bt au Canada malgré une consommation massive pour protéger les forêts (Industrie Canada, 1998)⁸. Le bio-insecticide produit à partir des boues a un coût inférieur à celui des pesticides importés utilisés actuellement au Canada, ce qui encouragera l'industrie canadienne à produire ses propres bio-insecticides et à les exporter sur le marché mondial ;
- **Intégration du marché des protéases** : Cette technologie permettra à l'industrie canadienne de se diversifier et de rivaliser sur d'autres marchés profitables comme celui des protéases alcalines. Le procédé BT-INRS permet de produire des protéases alcalines ayant beaucoup de valeur dans plusieurs secteurs industriels comme celui des détergents. Elles représentent aussi un intérêt grandissant en biotechnologie forestière parce qu'elles sont utilisées pour améliorer les procédés des industries de pâtes et papiers et pour remplacer les produits chimiques lors du blanchiment des pâtes ;
- **L'essor d'une nouvelle bio-industrie** : Si le procédé BT-INRS connaît un succès commercial suite à sa commercialisation et devient une histoire de réussite (« success story »), beaucoup d'autres procédés de PVA basées sur des eaux usées, des boues et des biomasses résiduelles verront le jour. Les PVA de ces nouvelles technologies pourront intégrer des débouchés commerciaux fructueux et instaurer une forte industrie de produits biologiques capables de rivaliser avec les produits existants (fabriqués à partir de combustibles fossiles ou de biomasses fraîches). Le procédé BT-INRS sera implanté à une série de technologies environnementales qui

⁸ La protection des forêts canadiennes nécessite des investissements importants. Par exemple, au Québec, la dernière épidémie de larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette a détruit plus de 235 millions de mètre cube de pins et d'épinettes, soit l'équivalent de 10 années de fertilité, valant 60 milliards US\$ alors que 72 millions US\$ ont été dépensés pour minimiser les ravages. Une autre infestation d'un cycle de 20 ans est prévue s'enclencher d'ici 2005 (SOPFIM, 2004).

maximiseront la valeur des matières résiduelles jusqu'à ce qu'elles soient complètement réutilisées, un objectif fondamental du développement durable.

En somme, le procédé BT-INRS permettra à l'industrie biotechnologique canadienne d'occuper une place importante dans l'industrie de l'environnement tout en protégeant sa précieuse industrie forestière. Jusqu'à maintenant, les résultats sont très encourageants : un potentiel insecticide (ou entomotoxicité) près de 17×10^3 unités internationales par microlitre (UI/ μ l) est obtenue avec les boues vis-à-vis une valeur approximative de $20,0 \times 10^3$ UI/ μ l pour l'insecticide FORAY 76B® de Abbott Laboratories (Chicago, É.-U.) produit dans un milieu à base de soja, d'amidon, de glucose et de sels minéraux⁹. Ces bons résultats sont obtenus selon des paramètres de fermentation et des stratégies de production bien établis.

1.2.1 Stratégies de production

Le procédé BT-INRS est une culture pure en aérobie et en mode discontinu des boues d'épuration par la bactérie *Bacillus thuringiensis* qui produit des spores ainsi que des CPI sous des conditions de culture déterminées par plusieurs études¹⁰. Diverses stratégies de production ont été étudiées pour augmenter le nombre de cellules et de spores ainsi que l'entomotoxicité de Bt produit dans les boues. Tirado (1997) a appliqué des chocs thermiques, ajouté des suppléments de glucose et d'extrait de levure, et hydrolysé à pH acide les boues, mais aucune augmentation de cellules, de spores ou d'entomotoxicité n'a été observée. D'autres stratégies ont cependant permis d'augmenter les cellules, les spores et l'entomotoxicité de Bt dans les boues. Le Tableau 1 donne un aperçu des meilleurs résultats obtenus avec ces différentes stratégies. Le lecteur est invité à consulter les ouvrages des chercheurs cités en référence pour en savoir davantage sur les stratégies.

⁹ Le Foray 76B est l'insecticide utilisé pour la lutte biologique contre la TBE dans les forêts canadiennes (SOPFIM, 2004). Il s'agit d'un concentré de bouillon fermenté dans lequel plusieurs ingrédients inertes ont été ajoutés pour stabiliser le produit. La forte concentration en spores et en CPI ainsi que l'effet insecticide potentiel de certains ingrédients inertes contribuent à la forte valeur en entomotoxicité.

¹⁰ Tirado (1997) a déterminé les principaux paramètres de fermentation pour la production de Bt dans les boues (agitation, pH, température) et étudié le rendement de la bactérie (cellules, spores, entomotoxicité) dans divers types de boue. Barnabé (2000) a développé une stratégie visant à accroître l'entomotoxicité de Bt en induisant sa sporulation. Le pourcentage d'inoculum de Bt nécessaire pour débiter une fermentation ainsi que la concentration idéale en solides des boues pour la croissance et l'entomotoxicité de Bt ont été déterminés par Lachaab (2003). Tyagi et al. (2002) ont réalisé des études sur la capacité de Bt à produire des protéases tout en conservant un fort pouvoir insecticide. Des études de caractérisation des protéases de Bt produites dans les boues ont été menées par Tyagi et al. (2002), Lamontagne (2004) et Yezza (2004). Vidyarthi et al. (2000, 2002) ont étudié l'effet de différents anti-mousse lors de la production de Bt en fermenteur et l'effet du rapport C/N de diverses boues mélangées. Vidyarthi et al. (2002) ont aussi étudié la relation de l'entomotoxicité avec les taux de croissance et de sporulation de Bt. Yezza (2004) a étudié la relation entre l'entomotoxicité et l'activité protéolytique. Finalement, Yezza (2004) et Brar (2004) réalisent à l'heure actuelle des études importantes sur la mise à l'échelle du procédé BT-INRS et la formulation de l'insecticide.

Tableau 1 Stratégies développées pour augmenter le rendement du procédé BT-INRS. Valeurs approximatives de l'entomotoxicité et des spores de Btk après 48h de fermentation de boues secondaires contenant environ 25 g/l de matières en suspension. Comparaison avec le milieu conventionnel à base de soja pour la production de Btk et le Foray 76B.

Milieu de culture	Stratégie*	Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)	Entomotoxicité (UIx10 ³ /µl)
Conventionnel (soja)	(1) Aucune	84 - 100	6,5 - 9,7
Boues	(2) Aucune	26	9,9
Boues	(3) CH ₃ COOH et NH ₄ OH	66	12,2
Boues	(4) Chocs de pH	44	14,2
Boues	(5) Combinaison de 3 et 4	147	15,3
Boues	(6) Nouvelles souches	≈ 100	≈ 17,0
Boues	(7) Suppléments	83	17,4
FORAY 76B (soja)	(8) Secret industriel	≈ 1000 à 100000	≈ 20,0

* (1) Milieu conventionnel pour la production de Btk (soja, glucose, amidon, sels minéraux) (fermentation en fermenteur de 15 L) (Barnabé et al., 2001) ; (2) Production de Btk dans les boues d'épuration secondaires (fermentation en fermenteur de 15 L) (Barnabé et al., 2001) ; (3) Remplacement de l'acide et de l'agent alcalin conventionnels (H₂SO₄ et NaOH) par l'acide acétique et l'hydroxyde d'ammonium pour le contrôle du pH durant la production de Bt (fermenteur de 15 L) (Barnabé et al., 2001) ; (4) Application de changements brusques de pH au courant de la fermentation appliqués pour induire la sporulation de Bt (fermenteur de 15 L) (Barnabé et al., 2001; Barnabé, 2000) ; (5) Combinaison des stratégies 3 et 4 (fermenteur de 15 L) (Barnabé et al., 2001) ; (6) Utilisation de nouvelles souches de Bt isolées des boues d'épuration (fioles et fermenteur de 15 L) (Mohammedi, 2004) ; (7) Ajout de divers suppléments tels que Tween 80 et résidus brassicoles de levures (fioles) (Leblanc, 2003) ; (8) Insecticide biologique à base de Btk de Abbott Laboratories produit dans le milieu conventionnel à base de soja, concentré par centrifugation et contenant divers additifs.

Avec ces travaux, le procédé BT-INRS est en voie d'atteindre des valeurs d'entomotoxicité équivalentes ou supérieures aux bio-insecticides commerciaux comme le FORAY 76B de Abbott Laboratories. Des travaux sur le mode de culture en « fed-batch » et la combinaison de plusieurs stratégies sont aussi effectués et les résultats sont fort prometteurs (Yezza, 2004). Toutefois, des questions persistent sur la performance du procédé BT-INRS. Comme l'indique le Tableau 1, les entomotoxicités observées dans les boues sont plus élevées que dans le milieu soja avec un nombre inférieur ou équivalent en spores. Les spores peuvent contribuer à l'entomotoxicité, mais cette observation suscite des interrogations quant à leur participation dans l'entomotoxicité envers les larves d'insecte ciblées ainsi que leur pouvoir insecticide proprement dit. Cette observation mérite une attention particulière et fait l'objet de la prochaine sous-section.

1.2.2 Des produits microbiens plus performants ?

En comparaison avec le milieu de culture conventionnel à base de soja pour la production de Bt, des expériences antérieures montrent que Bt atteint des entomotoxicités supérieures dans les boues malgré une plus faible concentration en spores viables. Selon le Tableau 1, pour un nombre inférieur ou équivalent de spores, l'entomotoxicité dans les boues secondaires est beaucoup plus élevée que celle observée dans le milieu soja. L'entomotoxicité spécifique pour une spore est grandement supérieure dans les boues que dans le milieu soja. De nombreux chercheurs ont

démontré que les spores agissent en synergie avec les CPI pour augmenter leur entomotoxicité envers les larves d'insectes (Donavan et al., 2001 ; Miyasono et al., 1994 ; Li et al., 1987 ; Dubois et Dean, 1985 ; Mohd-Salleh et Lewis, 1982 ; Burges et al., 1976 ; Dulmage et al., 1970 ; Somerville et al., 1970)¹¹. Toutefois, de hautes concentrations en spores ne donnent pas nécessairement de fortes entomotoxicités (Avignone-Rossa et Mignone, 1993 ; Farrera et al., 1998 ; İçgen et al., 2003a et b, Oskan et al., 2003). Ce phénomène s'explique en partie par la quantité ingérée de spores et de CPI par l'insecte et le degré de la synergie spores-CPI qui dépend de l'insecte ciblé.

Des questions sont soulevées à savoir pourquoi le produit du procédé BT-INRS est plus entomotoxique que le milieu soja malgré les concentrations inférieures ou équivalentes en spores. Les produits microbiens de Bt qui peuvent contribuer à l'entomotoxicité du bio-insecticide (ou facteurs de virulence) sont les suivants : les spores, les CPI, les protéines végétatives insecticides (PIV), des antibiotiques, plusieurs enzymes (protéases, chitinases, phospholipases...) et d'autres protéines connues (ex. : exotoxines) ou inconnues. Mis à part les spores dont les résultats sont indiqués dans le Tableau 1, tous ces produits microbiens pourraient être produits en abondance dans les boues d'épuration. De plus, il est possible que ces produits microbiens, incluant les spores, soient plus actifs en terme de pouvoir insecticide. À l'heure actuelle, aucune étude n'a encore été réalisée pour expliquer cette observation dans les boues¹². Si les boues s'avèrent être un milieu de culture stimulant la formation ou causant la surproduction de produits microbiens d'intérêt commercial, elles deviendraient alors un substrat de fermentation attrayant dans le secteur des biotransformations. Le temps investit dans des recherches laborieuses sur les suppléments organiques ou inorganiques dans les substrats ou sur les microorganismes génétiquement modifiés pour accroître les rendements de PVA serait alors concédé à des recherches prometteuses sur une grande diversité d'eaux usées, de boues d'épuration et de biomasses résiduelles. De plus, il serait pertinent que les futurs acquéreurs de la technologie puissent expliquer aux organismes

¹¹ Les spores seules sont toxiques si elles entrent en contact avec le sang de l'insecte et causent la septicémie. Elles contiendraient aussi des substances létales qui sont toxiques pour certains insectes ou agissent en synergie avec les CPI (Valéro et al., 1999). Toutefois, la toxicité des spores, sans les CPI, est très faible ou nulle (Dubois et Dean, 1985). En effet, une suspension de Bt contenant des CPI et des spores peut être de 5 à 600 fois plus toxique qu'une suspension contenant uniquement des spores (Valéro et al., 1999). L'entomotoxicité des spores est discutée plus en détail à la section 2.1.2.3.

¹² Sachveda et al. (1999a) ont répertorié plusieurs travaux sur la production de Bt à partir de sous-produits de l'industrie agro-alimentaire. Des variations d'entomotoxicité étaient observées, indépendamment des concentrations de spores ou de CPI. Les auteurs affirment que ce phénomène est fréquent lorsque Bt est produit dans des milieux de culture non conventionnels en raison de leur composition en nutriments qui est difficile à contrôler et qui varie d'un sous-produit à un autre.

responsables de la lutte anti-parasitaire pourquoi l'entomotoxicité de Bt est plus élevée dans les boues.

Dans le cadre du procédé BT-INRS, il serait intéressant de déceler les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des boues responsables de la formation de produits plus actifs en terme de pouvoir insecticide et/ou de la surproduction des produits contribuant à l'entomotoxicité. Les stratégies présentées dans le Tableau 1 ne tiennent pas compte de deux caractéristiques importantes des boues qui influenceraient le rendement de Bt en termes de spores produites et d'entomotoxicité : la disponibilité des éléments nutritifs et la concentration de matières en suspension (MES). Une stratégie influençant ces deux facteurs pourrait accroître davantage le rendement du procédé BT-INRS.

1.2.3 Les boues d'épuration municipales : une matière première universelle, mais un défi pour la fermentation industrielle

Les procédés industriels nécessitent des matières premières accessibles et peu coûteuses pour qu'ils puissent être rentables. Dans un contexte industriel de biotransformation, les boues d'épuration des eaux usées d'origine municipale peuvent être considérées comme une matière première bon marché puisqu'elles contiennent beaucoup d'éléments nutritifs nécessaires à la culture des microorganismes. Selon la littérature scientifique consultée, elles n'ont jamais été utilisées comme substrat de fermentation dans ce secteur. Les caractéristiques nutritives et rhéologiques des boues d'épuration sont différentes des milieux de fermentation conventionnels et leurs particularités représentent un défi de taille pour les biotechnologistes. Dans le cadre de ce travail, deux facteurs susceptibles d'influencer le rendement du procédé BT-INRS ont été identifiés. Ils sont abordés dans les prochaines sous-sections.

1.2.3.1 La biodisponibilité des éléments nutritifs dans les boues

Les entomotoxicités obtenues avec le procédé BT-INRS atteignent jusqu'à $17,0 \times 10^3$ UI/ μ l avec les récentes stratégies développées, alors que le nombre de spores dépasse parfois 1×10^9 spores par millilitre. Cependant, ces nouvelles techniques n'exploitent pas la valeur nutritive intrinsèque des boues d'épuration. Les boues sont un milieu de culture complexe dans lequel les éléments nutritifs ne sont pas entièrement disponibles sous une forme assimilable par Bt. Ces éléments sont insolubles, complexes, non conformes au site actif des enzymes bactériennes, piégés dans les matières en suspension (amas de matière organique, polymères extracellulaires, de cellules ou de

débris cellulaires) ou adsorbés sur leur surface. Ils peuvent devenir un facteur limitant pour la production de Bt dans les boues.

Ce problème se manifeste particulièrement lorsque certaines boues municipales sont utilisées. Les meilleures entomotoxicités et concentrations en spores de Bt sont obtenues dans les boues municipales issues du traitement secondaire des eaux usées appelées « boues secondaires » (Tirado, 1997; Barnabé, 2000; Lachhab et al, 2001). Pour accroître la portée du procédé BT-INRS qui vise essentiellement à utiliser les boues municipales comme matière première pour diverses bioproductions, des études sur les boues primaires et les boues mixtes (mélange de boues primaires et secondaires) ont été réalisées. Selon les travaux de Barnabé (2000) et Lachhab (2001), les boues mixtes donnent de plus fortes entomotoxicités et concentrations en spores que les boues primaires. Toutefois, les concentrations en spores et les entomotoxicités obtenues dans les boues mixtes sont plus faibles que celles obtenus dans les boues secondaires. La faible biodisponibilité des éléments nutritifs contenus dans les boues mixtes, en termes de concentration, de solubilité et de complexité (ou encore de conformité métabolique), serait principalement responsable de ce phénomène. Une stratégie visant à augmenter la quantité d'éléments nutritifs biodisponibles dans les boues mixtes (et secondaires) pourrait accroître le nombre de cellules et de spores ainsi que la formation des métabolites insecticides de Bt. Des réactions d'hydrolyse et d'oxydation partielle permettraient peut-être de solubiliser une partie des éléments nutritifs et augmenter le rendement du procédé BT-INRS.

1.2.3.2 Concentration de la matière en suspension des boues

Selon Vidyarthi et al. (2002), une plus grande concentration d'éléments nutritifs disponibles dans les boues augmenterait le nombre de spores et l'entomotoxicité de Bt. Des études ont été menées sur la production de Bt dans des boues très concentrées en MES (Lachhab et al., 2001 ; Vidyarthi et al., 2002). Malheureusement, l'utilisation d'une boue ayant une concentration supérieure à 25 g/l de matière en suspension (MES) donne des valeurs plus faibles en entomotoxicité. Selon les auteurs, les MES affectent l'entomotoxicité de Bt lorsque leur concentration est supérieure à 25 g/l. Ces baisses sont attribuables à un phénomène de l'inhibition par le substrat ou une distribution déficiente de l'oxygène dans le milieu de culture. Les particules et les polymères extracellulaires des boues très concentrées en MES peuvent interférer avec l'activité des enzymes bactériennes ou les processus de transport des nutriments à travers la membrane bactérienne. La viscosité élevée des boues très concentrées en MES peuvent affecter la distribution de l'oxygène lors de la fermentation, un élément très important pour la croissance, la sporulation et la production des CPI

de Bt (Avignone-Rossa et Mignone, 1993 ; Vidyarthi et al., 2002). L'augmentation de l'aération lors la production de Bt en fermenteur de 15 litres dans des boues plus concentrées en MES a été suggérée pour contrer ce problème, mais cela n'a pas permis d'obtenir des entomotoxicités plus élevées (résultats non publiés). Une stratégie modifiant les caractéristiques des boues (disponibilité des éléments nutritifs, taille des particules, viscosité) concentrées à plus de 25 g MES/l pourrait améliorer le rendement du procédé BT-INRS (en termes de cellules et spores produites, d'entomotoxicité et d'activité protéolytique).

Dans un contexte de production de Bt comme le procédé BT-INRS, il est important de développer une stratégie capable d'améliorer les caractéristiques nutritives et rhéologiques des boues pour la croissance, la sporulation et la production de métabolites insecticides. Pour proposer une telle stratégie, une mise à jour sur la production de Bt et les méthodes de traitement des boues est nécessaire. Le prochain chapitre présente une revue de littérature qui conduit aux hypothèses et aux objectifs de recherche du présent travail.

CHAPITRE 2: REVUE DE LITTÉRATURE

La revue de littérature est divisée en deux sections. La première section décrit la bactérie *Bacillus thuringiensis* et ses plus importants produits microbiens. Une attention particulière est accordée aux éléments nutritifs stimulant la production des produits microbiens de *B. thuringiensis*. Ensuite, la deuxième section décrit les processus d'hydrolyse et d'oxydation partielle des boues. L'accent est mis sur les boues d'épuration d'origine municipale. Des techniques de traitement sont énumérées et discutées afin de sélectionner celles qui sont susceptibles d'améliorer la performance du procédé BT-INRS.

2.1 *Bacillus thuringiensis* : une bactérie pionnière de la lutte biologique

Instauratrices de la lutte biologique, les souches entomopathogènes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) rivalisent avec les pesticides chimiques depuis l'avènement des réservoirs de fermentation pour la production à grande échelle dans les années 50 (Joung et Côté, 2000) et la découverte en 1970 d'une souche hautement entomotoxique, soit la souche HD-1 de Bt sérovar *kurstaki* (Btk HD-1) (Dulmage, 1970)¹³. Maintenant, plus de 200 insecticides microbiologiques à base de Bt sont commercialisés à travers le monde pour la lutte biologique en milieux agricoles et forestiers et dans le secteur publique de la santé¹⁴. Les suspensions de Bt sont les plus populaires des bio-insecticides microbiens en occupant de 90 à 95% du marché des biopesticides (insecticides, herbicides, fongicides) et presque 4,5% du marché mondial des insecticides (incluant les insecticides

¹³ La découverte de la première souche entomopathogène de Bt a été faite en 1915 dans la province de Thuringia en Allemagne. Sa toute première description remonte en 1902 au Japon où elle portait le nom de *Bacillus sotto* et causait la mort des vers à soie (Milner, 1994).

¹⁴ Les principaux sérovats de Bt commercialisés sont (Lisansky, 1996 ; Copping, 1998 ; Schnepf et al., 1998) : (i) Bt sérovar *kurstaki*, utilisée notamment pour contrôler les populations de la fausse-teigne des crucifères en Amérique du Nord et surtout utilisée au Canada pour le contrôle des larves de la TBE ; (ii) Bt sérovar *israelensis*, utilisée pour combattre les moustiques et les mouches noires (vecteurs de maladies) qui sont un problème majeur dans plusieurs zones agricoles ou résidentielles à proximité de marécages, mais tout particulièrement dans les pays sous-développés ; (iii) Bt pathovar *tenebrionis* ou *san diego* (associée au sérovar *morrisoni*), principalement utilisée pour combattre les coléoptères dont la doryphore de la pomme de terre qui détruit des cultures entières de pommes de terre ; (iv) Bt sérovar *aizawai*, utilisée dans de plus petits marchés pour contrôler les lépidoptères, souvent résistants à Bt *kurstaki* ; (v) Bt sérovar *japonensis*, utilisée surtout contre les coléoptères phytophages du sol. Une tendance est aussi observée en biotechnologie environnementale pour le développement de plantes transgéniques exprimant les gènes de Bt afin de résister aux insectes ravageurs. L'expression des gènes codant pour les toxines insecticides de Bt par les plantes fait l'objet de plusieurs études et les expériences sur le terrain se sont avérées positives. Cependant, l'implantation de plantes ou d'arbres génétiquement modifiés exprimant les gènes de Bt dans l'écosystème est discutable car une surproduction de ces gènes dans l'environnement et leur transfert potentiel avec d'autres populations de plantes ou d'arbres contribueraient considérablement à la résistance des insectes face à ces gènes (Burgess, 1998).

chimiques) (Menn et Hall, 1998). La production annuelle et le marché mondial sont estimés à 13000 tonnes et 100 millions US\$ (Rowe et Margaritis, 2004).

Les prochaines sous-sections traitent des caractéristiques de Bt et ses principaux produits microbiens impliqués dans l'entomotoxicité.

2.1.1 Caractéristiques générales

Bt est une bactérie ubiquiste de l'environnement, aérobie, hétéroorganotrophe, Gram positive et sporulante (Morris et al., 1996 ; Avignone-Rossa et Mignone, 1995 ; Benoît et al., 1990 ; Norris, 1971). Bt a la forme d'un bâtonnet droit (0,5-2,5 x 1,2-10 μm) et les cellules végétatives se présentent souvent en paire ou en chaîne sous des conditions normales de croissance (Sneath, 1984). Les cellules contiennent une seule spore ovale qui réfracte la lumière au microscope à contraste de phase (Figure 1). Les constituants des spores et le processus de sporulation sont expliqués en détail dans la section 2.1.3.



Figure 1 Cellules, spores et cristaux protéiques insecticides de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Microscopie à contraste d'interférence différentielle (X1600). Image modifiée avec le logiciel Adobe Photoshop de Adode Systems Inc. (É.-U.).

Bt est une bactérie mobile grâce à des flagelles péritriches. Leur antigène flagellaire est souvent utilisé pour identifier les sous-espèces de Bt. Sur 3500 isolats de Bt, Lecadet et al. (1999) de l'Institut Pasteur (Paris, France) ont de cette façon identifié plus de 82 sérovars de Bt. Parmi tous

ces sérovars, quelques uns sont entomopathogènes dont *kurstaki*, *israelensis*, *aizawai*, *morrisoni* et *japonensis*¹⁵.

Bt produit des inclusions cristallines parasporales durant sa sporulation. Ces inclusions parasporales distinguent Bt des autres bacilles comme *B. cereus* et *B. anthrax*. Elles contiennent des cristaux protéiques insecticides (CPI) dont la composante majeure, les delta-endotoxines, sont spécifiquement toxiques envers une grande variété d'insectes. Beaucoup d'études ont été réalisées pour démontrer l'innocuité des delta-endotoxines vis-à-vis la santé humaine et animale (Seigel, 2001; Shimada et al., 2003). Deux types de delta-endotoxines existent : les toxines spécifiques Cry qui agissent au niveau des récepteurs membranaires présents sur les cellules épithéliales de l'intestin des larves ; et les toxines non spécifiques Cyt (cytolysine) qui n'ont pas de récepteurs connus (Porcar et al., 2003)¹⁶. La grande majorité des gènes codant pour les delta-endotoxines sont situés sur les plasmides¹⁷. Les constituants, la formation et le mode d'action des CPI sont expliqués en détail dans la section 2.1.3.

Les delta-endotoxines s'inscrivent dans la longue liste des toxines protéiques produites par Bt incluant la bêta-exotoxine, l'alpha-exotoxine et la gamma-exotoxine (Faust et Bulla, 1982 ; Whiteley et Schepf, 1986 ; McClintock et al., 1995 ; Épinasse et al., 2002 ; İçgen et al., 2002b) ainsi qu'une entérotoxine typique de *Bacillus cereus* (Perani et al., 1998 ; Seigel, 2001). Elles sont décrites dans la section 2.1.5.

Bt produit une panoplie d'enzymes (protéases, chitinases, amylases, catalases...). La plupart des sérovars produisent des oxydases et des uréases. Plusieurs des enzymes jouent un rôle dans l'entomototoxicité comme les chitinases (Sampson et Gooday, 1998). Leurs caractéristiques sont décrites à la section 2.1.5. Certaines enzymes jouent non seulement un rôle dans l'entomototoxicité, mais aussi dans les processus de métabolisme et de sporulation comme les protéases. Elles font l'objet de la section 2.1.4.

¹⁵ Le lecteur est invité à consulter les documents de Copping (1998) et de Ziegler (1999) pour plus d'information sur les différents sérovars (entomopathogènes ou non).

¹⁶ Les toxines protéiques Cyt ont aussi une activité insecticide spécifique vis-à-vis certains diptères, mais moins fortes que les toxines Cry. Elles ont un faible poids moléculaire (25-30 kDa) (Escobar et al., 2000). Les toxines Cyt s'insèrent spontanément dans les membranes contenant des phospholipides insaturés (Du et al., 1999). Certains auteurs affirment que les toxines Cyt agissent en synergie avec les toxines Cry (Crickmore et al., 1995). La souche Btk HD-1 de ce travail détient plusieurs gènes *cyt*.

¹⁷ Les sous-espèces de Bt contiennent un ou plusieurs plasmides détenant jusqu'à 10-20% du matériel génétique de la bactérie (Baum et Malvar, 1995). Quelques sous-espèces de Bt possèdent plus de 17 plasmides (Faust et al., 1983) et leur taille varie entre 1,5 et 200 MDa (Aronson, 1993).

Bt produit aussi des antibiotiques qui ont une activité anti-microbienne envers les espèces du genre *Bacillus* et autres espèces bactériennes (Ahern et al., 2003 ; Mohammadi, 2004) ainsi que des espèces fongiques (Bourque et al, 1992). Ils sont décrits dans la section 2.1.5.

Les protéines insecticides végétatives (PIV) sont d'autres facteurs virulents de Bt qui participent à son entomotoxicité. Cette classe de protéines a la particularité d'être sécrétée à l'extérieur de la cellule lors de la croissance végétative, indépendamment de la sporulation. Leurs caractéristiques sont décrites dans la section 2.1.5.

2.1.2 Les spores

2.1.2.1 Structure et composition de la spore

Bt produit des **endospores** pour survivre aux conditions défavorables de croissance comme l'absence d'éléments nutritifs et les températures élevées. Elles contiennent de l'acide dipicolinique (pyridine-2 : acide 6 dicarboxylique ou DAP) qui constitue 5-15% de leur masse sèche. Cette composante les distingue des autres formes de spores (exospores, kystes et conidies) produites par divers microorganismes. Une illustration d'une endospore et une description de ses structures sont disponibles à l'Annexe 2.

Le phosphore et le calcium sont les éléments inorganiques les plus importants contenus dans les structures de la spore. Le phosphore occupe 7% de la masse sèche de la spore et le calcium, 2-3%. Le calcium et le DAP sont importants pour la stabilité de la spore : en combinaison dans la spore, ils sont impliqués dans son développement et sa résistance à la chaleur (Murrell, 1969 ; Pelzcar, 1993). Le manganèse, le cuivre et le zinc participent aussi à la stabilité en formant des complexes avec le DAP (Gould, 1969 ; Lundgren et Cooney, 1962 ; Powell et Strange, 1956). Le potassium et le magnésium sont deux autres éléments inorganiques majeurs de la spore et servent de cofacteurs pour des réactions métaboliques durant la sporulation (Lundgren et Cooney, 1962).

Ainsi, beaucoup d'éléments organiques et inorganiques sont exigés pour que la formation des éléments structuraux de la spore soit possible. Le nombre de spores produit est plus élevé lorsque ces éléments se retrouvent en grande quantité dans le milieu. Il est donc important que ces éléments soient accessibles à Bt lorsque celle-ci croît dans un milieu aussi complexe que les boues d'épuration.

2.1.2.2 Sporulation

Durant la sporulation bactérienne, le métabolisme de la cellule change considérablement : la croissance végétative cesse, les revirements métaboliques augmentent et les réserves s'accroissent. Ces événements physiologiques et biochimiques survenant durant la sporulation sont régulés par induction ou par répression d'enzymes ou autres facteurs liés à l'expression génétique. Les éléments nutritifs tels que le glucose, l'azote et le phosphore jouent un rôle très important dans la différenciation cellulaire et la sporulation du genre *Bacillus*. L'épuisement de ces éléments nutritifs active un réseau de gènes régulateurs qui activent à leur tour des systèmes effecteurs pour lutter contre les conditions défavorables de l'environnement. La **répression catabolique** par le glucose est l'un de ces mécanismes connus pour réguler la sporulation ainsi que la production de métabolites secondaires comme les entomotoxines. La cellule accorde la priorité au métabolisme du glucose en utilisant les éléments azotés et en réduisant l'activité enzymatique des autres voies métaboliques nécessaires à la sporulation (Halvorson, 1957; Hardwick et Foster, 1969; Piggot et Coote, 1976). Bref, la sporulation est entamée lorsque le glucose est entièrement consommé dans le milieu de croissance.

La formation de spores s'effectue en sept étapes. La Figure 2 résume les étapes de la sporulation et de la production des CPI chez Bt. Plus de 80 gènes sont impliqués dans le processus de sporulation¹⁸. La composition en éléments nutritifs du milieu influence l'induction et la répression de tous ces gènes. Plusieurs autres facteurs favorisent ou inhibent le processus de sporulation. Ils sont énumérés dans le Tableau 2.

¹⁸ La régulation génétique de la sporulation requiert l'interaction des produits protéiques de plusieurs gènes : *Spo 0A, -B, -E, -F, -H, -J* et *-K*, soit les gènes permettant la sporulation ; *Abr B, Hpr* et *Sin*, soit les gènes produisant des répresseurs de la sporulation. Une cascade de facteurs sigma contrôle les événements de la sporulation. Tous les facteurs sigma ont la même fonction qui est de reconnaître un promoteur et d'autoriser l'amorçage de la transcription par l'ARN-polymérase (Pelmont, 1993). Baum et Malvar (1995) ainsi que Piggot et al. (1994) ont publié d'excellents articles à ce sujet.

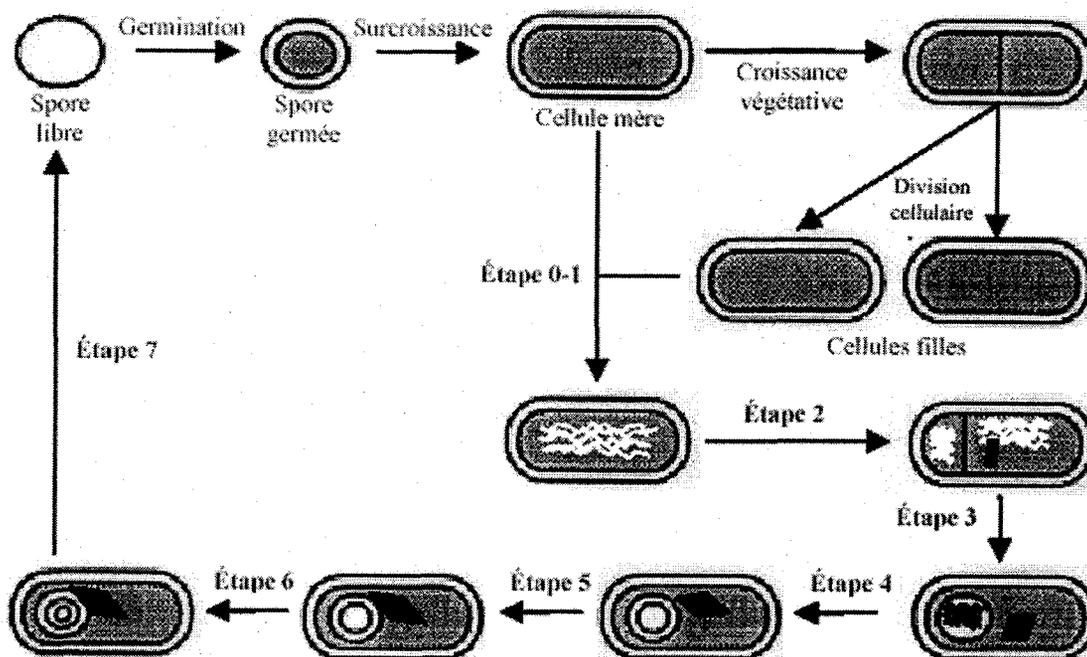


Figure 2 Schéma de la sporulation et de la production des CPI de Bt (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Piggot et Coote, 1976 ; Bulla et al., 1980 ; Sneath, 1984 ; Slepecky et Hemphill, 1992 ; Piggot et al., 1994). Étape 1 : synthèse de l'ADN et formation d'un filament axial de chromatine par la condensation de deux nucléotides supportés par les mésosomes. Étape 2 : formation d'un septum par l'invagination de la membrane à l'une des extrémités de la cellule et début de la synthèse du/des CPI parasporaux. Étape 3 : formation du protoplaste (spore avec une membrane cytoplasmique libre dans la cellule) et assemblage des sous-unités protéiques du CPI. Étape 4 : production de la membrane cellulaire et du cortex autour du protoplaste sporal et augmentation de la taille du cristal. Étape 5 : synthèse des couches protéiques sporales et fin de la synthèse du CPI. Étape 6 : maturation de la spore, accroissement de sa réfringence et de sa résistance (chaleur, solvants inorganiques...), déshydratation et accumulation du DAP et du Ca^{2+} . Étape 7 : Lyse de la cellule et libération de la spore et du CPI.

Tableau 2 Quelques facteurs influençant la sporulation de Bt.

Facteurs	Effet	Référence
pH	Le processus de sporulation est optimal à 30°C et à pH 7. La sporulation bactérienne est réduite à des pH supérieurs à 7,6, diminuée considérablement sous pH 6 et inhibée sous pH 5,5. Le pH influence la conformation des enzymes produites pour la sporulation en modifiant les charges de certaines acides animés des protéines, ce qui affecte leur activité enzymatique.	Havolrson, 1957 ; Salama et al., 1983 ; Morris et al., 1996
Température	Le processus est optimal à 30°C. La température affecte le taux de sporulation et les propriétés des spores. Les hautes températures peuvent apporter des changements réversibles ou irréversibles dans la conformation les protéines. Pendant la sporulation, des changements d'une température à une autre diminuent la résistance à la chaleur et le nombre de spores formées. La température affecte le processus de la sporulation au niveau enzymatique (conformation structurale des protéines) et au niveau de l'expression des gènes nécessaires à la formation des spores (inactivation d'inducteurs par exemple). Les spores formées à de hautes températures sont plus résistantes à la chaleur et leur contenu en DPA, Ca, Mg et Mn augmentent. D'autres effets sont décrits dans Barnabé (2001).	Havolrson, 1957 ; Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Salama et al., 1983 ; Morris et al., 1996 ; Pelmont, 1993a et 1993b.
Aération	La sporulation est optimale à forte aération. Si une limitation en oxygène survient au cours de la fermentation, le processus de sporulation peut être paralysé de façon permanente.	Avignone-Rossa et Mignone, 1992 ; Pearson et Ward, 1988 ; Yang et Wang, 1998
Acides aminés	Le glutamate stimule la sporulation alors que l'alanine l'inhibe.	Foster et Heiligang, 1949 ; Gould, 1969
Éléments inorganiques	Le Ca, le Mn, le Mg, le P inorganique, le Cu, le Fe, le Co et le Zn stimulent la sporulation. Plusieurs d'entre-eux sont incorporés dans la spore et accroissent sa stabilité ainsi que sa résistance.	Bernhard et Utz, 1993 ; Sachdeva et al., 1999a ; Murrell, 1961
Acides organiques	Les acides organiques facilement assimilables comme le malate et le pyruvate inhibent la sporulation.	Hardwick et Foster, 1969
Acides gras saturés	Ils inhibent la sporulation en interférant avec l'activité de la KinA impliqué dans le processus de sporulation.	Piggot et al., 1994 ; Barnabé, 2001
Tween 60	Des détergents comme le Tween 60 favorisent le processus de sporulation en améliorant la solubilité des protéines impliquées.	Morris et al., 1996
Glucose et autres sources de carbone simples	Le processus de sporulation est normalement régulé par le mécanisme de la répression catabolique par le glucose.	Halvorson, 1957 ; Hardwick et Foster, 1969 ; Piggot et Coote, 1976
Sources d'azote simples	Le processus de sporulation est aussi régulé par des sources d'azote simples via un mécanisme de rétroaction (régulation de l'activité des enzymes déjà formées et arrêt de leur synthèse par les métabolites fabriqués).	Pearson et Ward, 1988 ; Alves et al., 1997
Rapport C/N	Un faible ratio C/N favorise la sporulation. Une balance entre le contenu entre les sources d'azote et de carbone dans le milieu est important pour le métabolisme de Bt La croissance serait favorisée par un faible ratio, ce qui diminuerait rapidement les sources simples de carbone responsables de la répression catabolique. Bt peut alors réguler plus facilement l'expression de ses gènes en faveur de la sporulation.	Pearson et Ward, 1988 ; Morris et al., 1996 ; Farrera et al., 1998 ; Vidyarthi et al., 2002

Idéalement, pour qu'une spore soit thermostable et conserve sa viabilité sur une longue période de temps, le processus de sporulation doit s'effectuer au complet afin de former une spore dite « mature ». Des facteurs biologiques, chimiques, physiques ou rhéologiques peuvent affecter le processus de sporulation et conduire à la formation de spores incomplètes (immatures) aux fonctionnalités moindres¹⁹. Une mauvaise maturation des spores affecte aussi la taille et la forme

¹⁹ Les étapes 4, 5 et 6 de la sporulation sont très importantes pour la résistance de la spore et ses fonctionnalités insecticides. La formation du cortex et des couches protéiques, suivie d'une maturation de la spore sont les événements qui surviennent lors de ces étapes. Si une faible quantité de DAP ou d'ions calcium sont insérées dans la spore au cours de l'étape 4, la spore sera plus vulnérable aux conditions défavorables du milieu après sa libération de la cellule. Si moins de facteurs de virulence sont incorporés dans les couches protéiques de la spore au cours de l'étape 5 (voir section 2.1.2.3), la spore sera moins entomotoxique. Si l'étape 6 est écourtée, les derniers événements contribuant à ses propriétés de résistance et ses fonctionnalités insecticides n'auront pas lieu. La spore sera immature et moins apte à survivre et à provoquer une septicémie chez les larves d'insecte.

des CPI, ce qui influence leur entomotoxicité. Starzak et Bajpai (1991) ainsi que Vidyarthi et al. (2002) suggèrent qu'une faible croissance bactérienne favorise la formation et la maturation des spores et fournit suffisamment de temps pour la formation des CPI. Bernhard et Utz (1993) affirment que la balance entre les différentes sources d'éléments nutritifs doit être adéquate pour éviter de fortes concentrations en cellules et une sporulation faible ou nulle. Les facteurs environnementaux peuvent aussi provoquer la germination de la spore en cellule végétative (voir Figure 2)²⁰. La disponibilité des éléments nutritifs (en termes de solubilité, de concentration et de conformité métabolique) ainsi que les caractéristiques rhéologiques du milieu de fermentation doivent donc être appropriées pour la maturation des spores de Bt tout en minimisant leur germination.

2.1.2.3 Entomotoxicité des spores

Les spores de Bt provoquent la septicémie chez les larves d'insectes. Dans le cas des lépidoptères, une fois que les cellules épithéliales de l'intestin des larves sont endommagées par les delta-endotoxines de Bt, les spores ingérées peuvent pénétrer dans le sang à partir de ces ouvertures. Les spores germent et les cellules végétatives envahissent le sang pour finalement causer la mort de la larve (Mohd-Salleh et Lewis, 1982; Porcar et Juarez-Pérez, 2003).

L'effet insecticide de la spore peut aussi être attribué à la présence de protéines similaires aux δ -endotoxines dans ses couches protéiques (Somerville et al., 1970 ; Burges et al., 1976 ; Aronson et al., 1982 ; Mohd-Salleh et Lewis, 1982 ; Johnson et al., 1998 ; Du et Nickerson, 1996) ou autres substances létales qui agissent en synergie avec les δ -endotoxines (Valéro et al., 1999). Johnson et al. (1998) ont étudié l'entomotoxicité de différents mélanges de spores irradiées et de CPI. Ils ont constaté que les spores perdaient 53% de leur efficacité après 2h d'irradiation et conservaient 28% de leur toxicité après 4h d'irradiation. Cette toxicité était attribuée à la présence de protéines dans les couches protéiques de la spore similaires aux δ -endotoxines contenues dans les CPI.

Plusieurs auteurs ont étudié la relation entre les spores et l'entomotoxicité (Donavan et al., 2001 ; Farrera et al., 1998 ; Miyasono et al., 1994 ; Li et al., 1987 ; Dubois et Dean, 1985 ; Mohd-Salleh et Lewis, 1982 ; Burges et al., 1976 ; Somerville et al., 1970 ; Dulmage et al., 1970). Certains des travaux démontrent qu'il existe une relation entre les spores et l'entomotoxicité de Bt alors que

²⁰ Lors de la culture de Bt dans les boues d'épuration, la dégradation microbienne des MES et le brassage du milieu peuvent libérer des germinants. Des spores peuvent alors germer. Le processus de germination est décrit à l'Annexe 2.

d'autres la contestent. Les points saillants de ces travaux sont décrits à l'annexe 3. Parmi ces travaux, citons la publication de Donovan et al. (2001). Ces auteurs répertorient plusieurs études où des spores purifiées de diverses sous-espèces de Bt ont été ajoutées à des suspensions de CPI purifiés, ce qui pouvait augmenter l'entomotoxicité de 10 fois envers les larves de la fausse-teigne des crucifères (*Plutella xylostella*) et de la noctuelle de la betterave (*Spodoptera exigua*), de 35 fois envers les larves de la pyrale indienne de la farine (*Plodia interpunctella*) et de 1000 fois envers la fausse-teigne de la cire (*Galleria mellonella*). Ces études indiquent que la synergie spore-CPI dépend entre autres de la sous-espèce de Bt et l'insecte cible. Dans ce travail, les insectes cibles sont les larves de *Choristoneura fumiferana* (TBE de l'est) et *C. occidentalis* (TBE de l'ouest) alors que la sous-espèce produite est Btk HD-1. La synergie spore-CPI de Btk HD-1 sur les larves de TBE n'est pas documentée. Toutefois, la synergie a déjà été démontrée sur les larves de la fausse-teigne des crucifères. Misayano et al. (1994) ont montré qu'en présence de spores purifiées de Btk HD-1, la mortalité des larves de la fausse-teigne des crucifères causée par les CPI est de 146 fois supérieure à celle observée en absence de spores.

La maturité de la spore est aussi très importante pour contribuer à l'entomotoxicité. Une spore mature et fonctionnelle serait plus apte à causer la septicémie qu'une spore immature. Elle pourrait aussi contenir plus de δ -endotoxines (ou de protéines similaires) dans ses couches protéiques. Un milieu de culture qui offre les meilleures conditions pour la maturation des spores est donc souhaitable pour la production de Bt.

2.1.3 Les delta-endotoxines

2.1.3.1 Structure des cristaux et classement des delta-endotoxines

Les delta-endotoxines constituent le plus important groupe de toxines produites par Bt. Leur forme, leur composition et leur nombre varient selon les sous-espèces de Bt. Elles sont contenues dans des inclusions cristallines appelées les cristaux protéiques insecticides (CPI). Les CPI sont des glycoprotéines insolubles de 130 à 160 kDa et contiennent particulièrement des ponts disulfures qui contribuent à leur stabilité (Huber et al, 1981). La forme des CPI est bipyramidale, cubique, rectangulaire (plat), sphérique, rhomboïde et parfois irrégulière (Schnepf et al., 1998). La structure tridimensionnelle de ces protéines est bien décrite par Schnepf et al. (1998) ainsi que Aronson et Shaï (2001). Les inclusions cristallines occupent de 20 à 30% de la masse sèche des cellules sporulantes. Le caractère insoluble des CPI et les inclusions offrent une protection contre l'activité protéolytique des protéases produites par Bt au cours de la fermentation (Agaisse et Lereclus,

1995). Les CPI réfractent la lumière au microscope à contraste de phase (Bulla et al., 1980). Les CPI peuvent contenir de 7 à 10% de δ -endotoxines²¹. Ces δ -endotoxines sont contenues sur un ou plusieurs fragments protéiques libérés suite à la protéolyse du cristal par les protéases de l'insecte²². Les δ -endotoxines sont toxiques pour différents ordres d'insectes et sont codées sur les gènes *cry*. Ces gènes sont divisés en plusieurs classes et sous-classes qui diffèrent dans leur activité insecticide, leur séquence d'acides nucléiques et la taille du CPI formé (Copping et Menn, 2000). Les principaux gènes sont : *cry1* (spécifiques vis-à-vis les lépidoptères) ; *cry2* (spécifiques vis-à-vis les lépidoptères et les diptères) ; *cry3* (spécifiques vis-à-vis les coléoptères) ; *cry4* (spécifiques vis-à-vis les diptères) ; *cry5* (spécifiques vis-à-vis les lépidoptères et les coléoptères)²³. Des études ont aussi été publiées sur des souches actives contre d'autres ordres d'insectes (hyménoptères, homoptères, orthoptères et mallophages), des nématodes, des acariens et des protozoaires (Schnepf et al., 1998). Les gènes *cry* sont localisés sur les plus gros plasmides (>30MDa) et quelques-uns se situent dans le chromosome de la bactérie. La souche bactérienne utilisée dans ce travail, Btk HD-1, possède les gènes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2A* et *cry2B* qui sont distribués sur 12 plasmides (Baum et Malvar, 1995)²⁴.

2.1.3.2 Formation des cristaux

La formation des CPI coïncide avec la sporulation chez Bt. L'accumulation des CPI commence à la troisième étape de la sporulation et continue jusqu'à la cinquième (voir Figure 2). Selon Baum et Malvar (1995), l'expression des gènes *cry* est retenue jusqu'à ce que les facteurs nécessaires à la sporulation activent leur transcription ou désactivent leurs répresseurs. Leur expression dépendrait des facteurs sigma qui sont très importants pour la régulation des gènes *spo* de la sporulation et aussi de la synthèse de protéines chaperonnes stabilisant les CPI (Aronson, 1993; Agaisse et

²¹ Pour une production de 0,5 mg de protéine par ml, chaque cellule fabriquerait $1-2 \times 10^6$ delta-endotoxines durant la phase stationnaire de croissance pour former un CPI (Agaisse et Lereclus, 1995).

²² Le poids moléculaire des fragments varie selon les CPI. Par exemple, les fragments des toxines de la famille Cry1 ont un poids variant entre 55 et 75 kDa (Pyronnet et al., 2003).

²³ Crickmore et al. (1998) ont proposé une nomenclature pour les gènes *cry* qui utilisent des chiffres arabes plutôt que romains (ex. : *cry1*). Cette nomenclature est maintenant utilisée dans la littérature scientifique.

²⁴ Les protéines issues des gènes *cry1Aa*, *cry1Ab* et *cry1Ac* contribuent à la formation d'un CPI de forme bipyramidale alors que la protéine du gène *cry2A* contribue à la formation d'un CPI de forme cubique (Baum et Malvar, 1995). Le plasmide qui détient le gène *cry1Ab* est auto-transmissible et a un poids moléculaire de 72 MDa. Les CPI de Btk peuvent contenir de l'arginine, de la sérine, de la glutamine et de la glycine ainsi que du glucose et du mannose (Lisansky, 1999 et 2000). Btk HD-1 produit un CPI de grande taille et un de plus petite taille. Le plus petit cristal est souvent inséré dans celui de grande taille.

Lereclus, 1995)²⁵. Le niveau d'expression individuel des gènes *cry* varie selon les souches (Porcar et Juarez-Pérez, 2003) et dépend du nombre de copies de gènes *cry* (Agaisse et Lereclus, 1995)²⁶. La stabilité de l'ARNm est aussi importante. Plus il est stable, plus il y a de gènes *cry* exprimés. Selon Schnepf et al. (1998), la demi-vie des ARNm des gènes *cry* est de 10 min, soit 5 fois plus élevé que la demi-vie moyenne de l'ARNm bactérien.

Les facteurs environnementaux jouent un rôle critique dans la modulation des voies de différenciation et de synthèse des entomotoxines. Quelques-uns de ces facteurs sont présentés au tableau 3.

²⁵ Plusieurs chercheurs citent en exemple certains gènes *cry* qui ne dépendent pas de la sporulation pour être transcrits (ex. : *cryIII*) (Agaisse et Lereclus, 1995 ; Baum et Malvar, 1995 ; Schnepf et al., 1998).

²⁶ Toutefois, selon Agaisse et Lereclus (1995), la production de delta-endotoxines n'est pas proportionnelle au nombre de copies de gènes *cry* car elle peut atteindre un maximum à un certain nombre de copies.

Tableau 3 Quelques facteurs influençant la production de cristaux protéiques insecticides (CPI) de Bt.

Facteurs	Effet	Référence
pH et température	La production est favorisée à pH 7. Certains auteurs affirment qu'elle peut diminuer à des pH inférieurs à 6,5 alors que d'autres ont de bons résultats entre 5,5 et 6,5. Si le contrôle du pH est possible lors de la fermentation, un pH 7 est normalement utilisé. De fortes températures peuvent provoquer la perte de plasmide alors que de faibles températures désynchronisent les processus de sporulation et de formation de CPI, ce qui peut dans les deux cas affecter la production des CPI.	Sikdar et al., 1991 ; Bihari et Bajpai, 1995 ; Tirado-Montiel et al., 1998 ; İçgen et al., 2002a
Aération	L'aération réduit la production si le taux d'aération est trop élevé ou s'il y a limitation en oxygène. Si la limitation en oxygène dure plus d'une heure, la formation de toxines peut être arrêtée de façon permanente. Elle influence aussi la taille des CPI et leur spécificité. De fortes aérations donnent de petits CPI alors que de fortes aérations donnent des CPI de plus grande taille.	Avignone-Rossa et Mignone, 1992 ; Lüthy et al., 1982 ; Scherrer et al., 1973 ; Yang et Wang, 1998
NaCl	L'ajout de NaCl augmente l'entomotoxicité. Selon la force ionique et le pH du milieu, le NaCl influence la solubilité des protéines nécessaires à la formation des CPI.	Morris et al., 1996 ; Zouari et Jaoua, 1999b
Tween 60 et 80	Les détergents favorisent le passage des composés dans les cellules et rendent plus accessibles les protéines solubles dans le milieu durant l'assemblage des sous-unités des CPI. Lors de la fermentation des boues d'épuration par Bt, le Tween 80 augmente considérablement l'entomotoxicité finale des boues fermentées.	Morris et al., 1996 ; Zouari et Jaoua, 1999b ; Leblanc, 2004 ; Brar et al., 2004
Acides aminés	De 20 à 30% des protéines des CPI sont synthétisées à partir des acides aminés présents dans le milieu de culture. Leurs effets sur la production des CPI dépendent de leur concentration car ils peuvent stimuler la croissance au détriment de la sporulation et la production de métabolites secondaires. Certains auteurs affirment que les acides aminés soufrés (ex. : cystéine) augmentent l'entomotoxicité de Bt alors que d'autres ont observé le contraire. L'arginine et le glutamate sont deux importants acides aminés qui constituent environ 45% des acides aminés présents dans les delta-endotoxines. L'aspartate peut aussi stimuler la production de CPI.	Rajalakshi et Sethna, 1977 ; Huber et Lüthy, 1987 ; Mummigatti et Rangunathan, 1990 ; Bihari et Bajpai, 1995 ; Morris et al., 1996 ; Vora et Shethna, 1999
Éléments inorganiques	Quelques éléments inorganiques sont nécessaires pour la production de métabolites secondaires insecticides (spécialement les CPI) comme le Ca, le P inorganique, le Cu, le Mg et le Mn alors que d'autres peuvent inhiber la production comme le Mo, le Zn et le Fe. Signalons que la balance ionique dans le milieu est très importante. Un manque ou un excès peuvent diminuer la production de métabolites secondaires. De plus, comme les éléments inorganiques influencent aussi la sporulation, leur effet positif sur la formation de métabolites secondaires peut être une conséquence indirecte sur la sporulation.	Sikdar et al., 1991 ; İçgen et al., 2002a ; Ozkan et al., 2003
Glucose et autres sources de carbone simples	Le processus de production des métabolites secondaires tels que les CPI est normalement régulé par le mécanisme de la répression catabolique par le glucose (et autres sucres simples).	Içgen et al., 2002b ; Ozkan et al., 2003
Sources d'azote simples (ex. : N-NH ₄ ⁺)	Le processus de production des métabolites secondaires comme celui des CPI est aussi régulé par répression catabolique en présence de sources d'azote simples comme le sulfate d'ammonium ou par rétroaction via les métabolites azotés.	Pearson et Ward, 1988 ; Alves et al., 1997 ; Zouari et Jaoua, 1999b ; İçgen et al., 2002b ; Ozkan et al., 2003
Rapport C/N	Un faible ratio C/N permet à Bt d'atteindre une meilleure entomotoxicité dans des milieux semi-synthétiques. Le ratio C/N ne doit pas être trop faible (< 5:1) ou trop élevé (> 11:1). Un ratio C/N bien balancé (environ 7:1) favorise la croissance des bactéries et la consommation des sources de carbone impliquées dans la répression catabolique. Bt peut réguler plus facilement l'expression de ses gènes en faveur de la sporulation et de la formation des CPI. Si Bt est cultivée dans les boues d'épuration, des ratios entre 7,9:1 et 9,9:1 donnent de fortes entomotoxicités.	Mummigatti et Rangunathan, 1990 ; Morris et al., 1996 ; Farrera et al., 1998 ; Vidyarthi et al., 2002

Selon Lüthy et al. (1982), le rendement en delta-endotoxine par nombre de spores produites est grandement influencé par le type de milieu et les conditions de culture. La répression catabolique par le glucose, des sucres simples ou des sources d'azote faciles à assimiler, spécialement le N-NH_4^+ , influence régulièrement les mécanismes de la formation des métabolites secondaires comme les CPI (Içgen et al., 2002b; Ozkan et al., 2003). De plus, en comparaison avec les microorganismes génétiquement modifiés qui sont parfois instables, plusieurs chercheurs considèrent que la manipulation des composants du milieu de culture est la meilleure stratégie pour la surproduction des produits microbiens car l'excrétion des métabolites secondaires fait partie de la stratégie de survie des microorganismes dans les environnements complexes (Dey et al., 2001).

Un milieu de culture comme les boues d'épuration contient les éléments organiques et inorganiques susceptibles de stimuler la production de spores et de CPI et d'augmenter leur nombre, mais ils ne sont pas entièrement disponibles pour les cellules végétatives (voir section 2.2.1). L'augmentation de leur disponibilité améliorerait le rendement de Bt dans ce milieu complexe. Il est important aussi que les sources de carbone et d'azote soient simples et facilement assimilables pour que certains éléments nutritifs soient complètement épuisés et que Bt puisse réguler l'expression de ces gènes en faveur de la sporulation et de la production des CPI.

2.1.3.3 Entomotoxicité des cristaux protéiques insecticides

Les CPI contiennent des protoxines qui doivent être protéolysées en fragments de faible poids moléculaire pour être toxiques. Les CPI sont d'abord ingérés par les larves d'insecte et sont solubilisées dans leur intestin où le pH est très alcalin. Les protoxines sont alors libérées et fragmentées par les protéases intestinales de l'insecte cible. Un ou plusieurs de ces fragments contiennent des delta-endotoxines, soit de courtes séquences toxiques d'acides aminés. Les delta-endotoxines entrent en contact avec un récepteur spécifique sur les cellules épithéliales et s'insèrent dans les membranes. Des pores sont formés et la perméabilité des cellules est altérée. Les gradients ioniques et la balance osmotique sont alors perturbés, provoquant éventuellement la lyse de la cellule. Les bactéries normales de l'intestin ainsi que les spores de Bt pénètrent dans les cavités, ce qui entraîne la paralysie complète du système intestinal de l'hôte. La larve ne peut plus se nourrir et meurt de faim, de septicémie ou d'une combinaison des deux²⁷. Les fonctionnalités des CPI dépendent donc de quatre processus : (i) la solubilisation des CPI ; (ii) la conversion de la protoxine en toxine ; (iii) la liaison des delta-endotoxines aux récepteurs à la surface des cellules ;

²⁷ Cooper (1994) ainsi que Aronson et Shai (2001) ont publié deux excellents articles sur le mode d'action des delta-endotoxines.

(iii) le processus de formation des pores. Ces processus déterminent la spécificité des toxines (Joung et Côté, 2000). Le bon déroulement de ces processus dépend des conditions physiologiques du système intestinal de l'insecte cible. Par exemple, un phénomène de glycosylation enzymatique peut survenir dans le système intestinal de l'insecte. Cette réaction peut modifier les récepteurs des cellules épithéliales intestinales sur lesquels se lient normalement les delta-endotoxines. La spécificité est donc altérée et l'entomotoxicité peut être affectée. La glycosylation enzymatique serait d'ailleurs impliquée dans le développement de la résistance des insectes aux delta-endotoxines (Candas et al., 2002).

Les caractéristiques des CPI (taille, contenu en delta-endotoxines, solubilité...) influencent leurs fonctionnalités et par conséquent leur entomotoxicité. Des variations mineures dans la séquence d'acides aminés d'une même toxine produite par différentes souches de Bt influencent la spécificité envers un insecte (Feldmann et al., 1995; Mohan et Gujar, 2001; Porcar et Juarez-Perez, 2003). Dès que la spécificité des entomotoxines est altérée, leur potentiel insecticide augmente, diminue ou reste inchangé. La taille des CPI et leur contenu en delta-endotoxines (quantité et type) sont deux importantes caractéristiques (Luthy et al., 1982; Höfte et Whiteley, 1989; Mohan et Gutar, 2001). L'entomotoxicité des CPI n'est cependant pas proportionnelle à leur taille ou à leur contenu en delta-endotoxines²⁸. Selon Mohan et Gujar (2001), la quantité de CPI et de delta-endotoxines biologiquement actives est un facteur déterminant. Bhattacharya (2000) affirme qu'un CPI entier, c'est-à-dire un cristal contenant toutes les sous-unités protéiques codées par les gènes *cry*, est plus toxique qu'un CPI incomplet produit dans une cellule autre que Bt. La solubilité du CPI est aussi importante. Il est souhaitable d'avoir des CPI insolubles pour pouvoir les récupérer et formuler les insecticides, mais ils doivent être aptes à la solubilisation lorsqu'ils seront ingérés par les larves d'insecte. Le degré de solubilisation des CPI dépend de leur structure quaternaire et tertiaire, de l'énergie des ponts disulfures et de la présence de composants spécifiques aux souches de Bt. Une réduction de la solubilité des CPI serait une raison pour expliquer la résistance des insectes envers Bt (Schnepf et al., 1998).

Les conditions de culture d'une souche de Bt influencent non seulement la formation, mais aussi les caractéristiques de ses cristaux. Elles définissent leurs fonctionnalités et leur entomotoxicité.

²⁸ Luthy et al. (1982) ont démontré que de petits cristaux étaient obtenus avec de fortes aérations, mais qu'il était plus toxique que les gros cristaux obtenus avec de faibles taux d'aération. Ces derniers contenaient peu de delta-endotoxines. Sachedeva et al. (1999) ont fait une excellente revue de littérature sur les facteurs influençant la production de Bt et ont remarqué que de fortes concentrations en delta-endotoxines ne donnent pas nécessairement une forte entomotoxicité. Par exemple, un milieu très concentré en source d'azote peut donner une forte concentration en delta-endotoxines, mais une faible entomotoxicité. Selon Sachedeva et al. (1999), l'entomotoxicité ne dépend pas des sources de protéines alors que la production de delta-endotoxines en dépend.

Les travaux de Faloci et al. (1990) montrent que l'activité insecticide de Bt var. *israelensis* varie de façon significative selon les milieux de culture. Les auteurs rapportent deux autres études dans lesquelles des observations similaires sont reportées. Les différences observées n'ont pas été attribuées au taux de croissance et au nombre de spores, mais plutôt à la concentration et aux types de fragments protéiques ainsi qu'aux diverses sources de carbone utilisées. Les travaux de Dulmage (1970) et Alves et al. (1997) ont émis des conclusions similaires à celles de Faloci et al. (1990) avec le sérovar *kurstaki*. Faloci et al. (1990) ont conclu que les effecteurs externes présents dans le milieu de culture agissent non seulement comme régulateur de la concentration en CPI, mais aussi comme régulateurs de leur composition. À titre d'exemple, Bhattacharya et al. (1993) ont affirmé que des réactions de glycosylation non enzymatique des CPI peuvent survenir lors de la fermentation et influencer l'entomotoxicité des cristaux. Les auteurs ont montré que le degré de glycosylation non enzymatique des CPI dépend de plusieurs facteurs dont la composition du milieu et les conditions de culture. La glycosylation non enzymatique est un type de réaction de Maillard où un sucre s'attache à un groupement aminé libre sur une molécule. Elle survient notamment à des pH supérieurs à 8 et inférieurs à 6. Les régions des CPI dans lesquelles des sucres sont présents peuvent être protégés contre la protéolyse. Cela interfère avec le clivage des protoxines dans l'intestin de la larve d'insecte et altère la spécificité des delta-endotoxines.

L'entomotoxicité des CPI dépend aussi de la présence d'autres éléments insecticides. La synergie avec les spores²⁹ et les produits des gènes *cyt* sont deux exemples.

Les boues d'épuration sont un milieu de culture alternatif dont les effets sur les caractéristiques et les fonctionnalités des CPI sont inconnus. Comme le milieu de culture influence les caractéristiques des CPI, les boues peuvent avoir un effet direct sur la taille, le contenu ou la solubilité des cristaux et un effet indirect sur leurs fonctionnalités dans le système intestinal des insectes. Selon les résultats sur le procédé BT-INRS, les boues permettent d'atteindre de fortes entomotoxicités. Les boues stimulent peut-être la formation de métabolites secondaires plus fonctionnels en terme de pouvoir insecticide. Par exemple, il pourrait y avoir formation de CPI contenant un plus grand pourcentage de delta-endotoxines actives.

²⁹ Plusieurs insectes ne requièrent pas la présence de spores pour que les CPI soient toxiques (insectes de « type 1 et 2 ») alors que leur présence est obligatoire pour d'autres (insectes de type 3) (Somerville et al., 1970 ; Burges et al., 1976 ; Asano et al., 2000).

2.1.4 Les protéases

2.1.4.1 Généralités

Les protéases ont comme principale fonction l'hydrolyse des liens peptidiques³⁰. Les protéases sont soit d'origine végétale comme la papaïne extraite d'une plante tropicale (*Carica papaya*), animale comme les pepsines bovines et porcines, ou microbienne comme les protéases alcalines (Rao et al., 1998). Les protéases microbiennes sont produites par des bactéries (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*...) ou des champignons (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*...) et sont généralement des endopeptidases. Ces dernières sont divisées en quatre groupes : les protéases acides, les métalloprotéases, les protéases alcalines sérines et les protéases cystéiques. Elles sont décrites à l'Annexe 4. Le lecteur est invité à consulter l'article de Rao et al. (1998) pour en connaître davantage sur les types de protéases, leurs modes d'action et leurs rôles physiologiques.

Les protéases ont plusieurs applications industrielles répertoriées par de nombreux auteurs (Ellaiah et al., 2002 ; Novo Nordisk, 2000 ; Meunier, 1999 ; Kumar et Takagi, 1999 ; Rao et al., 1998)³¹. Les protéases alcalines ont notamment une présence marquée dans l'industrie du détergent. À titre d'exemple, le marché de la subtilisine est estimé à plus de 200 millions US\$ (Demain, 2000) et la production à plus de 500 tonnes par année (Rao et al., 1998). Les protéases alcalines remplacent les produits chimiques acides ou à base de phosphate utilisés pour le blanchiment et enlèvent les taches tenaces de nature protéique. Elles sont stables à des pH situés entre 5 et 11 et elles sont parfois thermophiles (actives à des températures supérieures à 60°C). Ces deux caractéristiques sont importantes pour leur application dans les procédés de blanchiment qui s'effectuent généralement à pH alcalin et à température élevée.

³⁰ Elles sont divisées en deux catégories : les endopeptidases qui scindent les liens peptidiques des protéines et transforment les grandes chaînes de polypeptides en plus petits fragments; et les exopeptidases qui attaquent le lien peptidique près d'un groupe carboxyle libre -COOH (carboxypeptidases) ou près d'un groupe aminé libre -NH₂ (aminopeptidases). L'action combinée des endopeptidases et des exopeptidases transforment les protéines en acides aminés.

³¹ Les protéases sont utilisées dans les tanneries pour le délainage, l'assouplissement et le reverdissage des peaux et du cuir. Elles remplacent maintenant le sulfite de sodium qui contribuait à la présence de sulfures dans l'effluent de tannerie. Elles sont utilisées dans la récupération de l'argent dans les photographies usagées de rayons X et la fabrication de solvants organiques. Elles sont présentes dans le secteur médical (collagénases), l'industrie agro-alimentaire pour la transformation des légumes, du poisson et de la viande. Les protéases alcalines peuvent être appliquées dans le traitement des eaux usées d'usines de transformation d'aliments comme celles générées par l'abattage avicole, très concentrées en contaminants de nature protéique. Finalement, elles peuvent être utilisées par les procédés de blanchiment des pâtes dans les papeteries.

2.1.4.2 Protéases de Bt

Bt est une bactérie productrice de métalloprotéases, de protéases alcalines sérines et de protéases cystéiques qui font l'objet de plusieurs études (Donovan et al., 2001 ; Rukimini et al., 2000 ; Zouari et Jaoua, 1999a ; Hotha et Banik, 1997 ; Reddy et Venlateswerlu, 1997). Plusieurs de ses protéases sont intracellulaires alors que d'autres sont sécrétées à l'extérieur de la cellule. Les protéases intracellulaires sont impliquées dans la régulation du métabolisme bactérien et la formation des spores. L'influence des protéases de Bt sur l'entomotoxicité est encore peu documentée. Elles sont parfois confondues avec l'effet des protéases présentes dans l'intestin des insectes vulnérables à Bt qui participent au clivage de la protoxine. Certaines des protéases de Bt sont associées aux CPI et peuvent être impliquées dans la protéolyse des protoxines sous des conditions alcalines (ex. : intestin des larves). Cette implication est très importante car le clivage protéolytique joue un rôle dans l'activation de la protoxine et la spécificité des delta-endotoxines (Reddy et Venlateswerlu, 1997 ; Opper, 1999 ; Rukimini et al., 2000). Quant aux protéases sécrétées à l'extérieur de la cellule, elles servent normalement à protéolyser les sources d'azote pour la croissance de Bt (Içgen et al., 2002b). Ces protéases extracellulaires peuvent contribuer à l'entomotoxicité en s'associant aux spores (Donovan et al., 2001) et aux CPI (Chestukhina et al., 1978 ; Bulla et al., 1981). Par exemple, Bt secrète les métalloprotéases *InhA* (ou *InA*) et *InhB* (ou *InB*) qui sont impliquées dans la pathogénèse en raison de son habilité à dégrader l'attacine et la cécropine, deux protéines antimicrobiennes des lépidoptères et des diptères (Dalhammar et Steiner, 1984 ; Lovgran et al., 1990 ; Grandvalet et al., 2001)³². L'insecte devient plus vulnérable à l'inhalation de cellules bactériennes ou la germination de spores dans le système intestinal, particulièrement si le mode d'action des protéases bénéficie à ceux des CIP, des VIP et des chitinases qui brisent les cellules de l'intestin. Liu et al. (2000) font état d'une protéase alcaline extracellulaire qui peut hydrolyser les CPI sous conditions alcalines. Cette protéase est thermostable et émet une activité protéolytique maximale à pH 8.5-9.0 et 60°C en présence de CaCl₂. L'hydrolyse prématurée des CPI peut réduire leur entomotoxicité. Des études réalisées par Tyagi et al. (2002) ont démontré que Bt peut avoir une activité protéolytique jusqu'à 7 UI/ml comparativement à *B. licheniformis* qui donne 12 UI/ml dans les mêmes conditions de fermentation en milieu synthétique.

³² Dalhammar et Steiner (1984) ont démontré que la *InhA* dégrade spécifiquement les cécropines et les attacines du système immunitaire des larves du cécropia (*Hyalophora cecropia*). La production de *InhA* est induite au début de la sporulation et régulée par les produits des gènes *SpoA* et *Abr* (Grandvalet et al., 2001). Bt secrète deux autres protéases, la protéase alcaline *AprA* et la métalloprotéase *NprA*, mais elles ne sont pas impliquées dans la pathogénèse (Tan et Donovan, 2000).

2.1.4.3 Formation des protéases

Comme pour les spores et les CPI de Bt, des éléments organiques et inorganiques sont nécessaires pour former les protéases ou encore pour stimuler leur production. Il est important que ces éléments soient accessibles à Bt pour qu'elle produise des protéases au maximum de sa capacité. Les concentrations élevées en sucres (lactose, sucrose, ...) et les molécules simples d'azote (NH_4^+ , acides aminés, spécialement la glycine) répriment normalement la production d'enzyme alors que les acides organiques (acétate, citrate, ...) et les sources d'azotes complexes (liqueur de maïs, tryptone, caséine, ...) peuvent l'augmenter (Brussock et Currier, 1990 ; Ellaiah et al., 2002). Chez les bactéries du genre *Bacillus*, les protéases sont particulièrement produites lors de la transition de la phase exponentielle de croissance vers la phase stationnaire. Selon Chen et al. (2003), elles sont impliqués dans le processus de sporulation de Bt. Les auteurs ont démontré que l'absence de la protéase alcaline intracellulaire *ispA* provoquait un délai de 4h avant que la sporulation soit entamée. Selon les travaux de Zaouri et Jaoua (1999a et b), la production de protéases de Btk est induite dans les milieux complexes sans avoir d'effet négatif sur la production des δ -endotoxines. Les protéases peuvent potentiellement endommager les CPI (Alves et al., 1997) si le pH n'est pas contrôlé (pH 7) lors des dernières heures de la fermentation. Plusieurs éléments inorganiques (Ca, Cu, Co, B, Fe, Mg, Mn, Mo et P-PO_4^{3-}) sont requis pour la production des protéases alcalines. Le Ca, le Mg et le Mn sont particulièrement importants parce qu'ils contribuent à la thermostabilité des protéases. Le pH et la température sont deux autres facteurs importants. Leurs valeurs dépendent des microorganismes, mais il est souhaitable qu'elles soient maintenues à une valeur fixe durant la fermentation. L'agitation influence aussi la production alors que l'aération est un facteur limitant (Kumar et Takagi, 1999 ; Anwar et Saleemuddin, 1997).

2.1.5 Autres facteurs de virulence

Plusieurs autres métabolites secondaires de Bt ont un pouvoir insecticide similiaire aux δ -endotoxines comme les PIV. Certains métabolites contribuent à l'entomotoxicité des CPI ou des PIV comme les chitinases et quelques antibiotiques. Ces métabolites sont décrits dans le tableau 4. Des conditions de culture favorables à leur formation sont certes un atout pour la production de Bt. Dans le cas du procédé BT-INRS, l'amélioration de la disponibilité des éléments organiques et inorganiques dans les boues favoriserait la formation de métabolites secondaires. Bt produit aussi des exotoxines non désirées telles que la β -exotoxine, la α -exotoxine, la γ -exotoxine et une entérotoxine (voir tableau 4). Comme la présence de β -exotoxine est interdite dans les suspensions de Bt, les souches commercialisées sont de très faibles productrices d'exotoxines.

Tableau 4 Autres métabolites secondaires de Bt susceptibles de contribuer à l'entomotoxicité.

Métabolites secondaires	Caractéristiques
β -exotoxine	La β -exotoxine ou thuringiensine est hautement toxique pour plusieurs ordres d'insectes (lépidoptères, coléoptères, hyménoptères isoptères, orthoptères, quelques nématodes, mais particulièrement les diptères) et nuit au développement de leurs larves en empêchant la mitose cellulaire, affectant ainsi leur développement et causant des effets tératologiques parfois fatales. Cette protéine thermostable est un analogue de l'ATP qui inhibe l'activité de l'ARN polymérase en interférant avec les sites de liaison de l'ATP (Épinasse et al., 2002). Les gènes pour produire la β -exotoxine sont situés sur le chromosome et leur synthèse partage plusieurs étapes avec celle de métabolites essentiels (ex. : ATP). La mise en forme finale et la sécrétion de la β -exotoxine nécessitent les produits de l'expression de gènes codés sur les plasmides contenant les gènes pour les delta-endotoxines (Hernandez et al., 2003). Contrairement aux δ -endotoxines, la β -exotoxine n'est pas spécifique et peut affecter les organismes non ciblés. Elle est d'ailleurs toxique envers les cellules des mammifères et c'est pourquoi elle doit être absente des préparations insecticides (McClintock et al., 1995). Seulement quelques sous-espèces produisent la β -exotoxine.
α -exotoxine	L' α -exotoxine appelée phospholipase C ou lécithinase est capable de lyser plusieurs types de cellules en affectant les phospholipides des membranes. L' α -exotoxine doit être absente des préparations insecticides car elle peut avoir un effet néfaste sur les cellules des mammifères (Faust et Bulla, 1982).
γ -exotoxine	La γ -exotoxine est peu caractérisée et considérée comme inoffensive. Elle est cependant toxique envers les mouches à scie (<i>Tenthredinidae</i>), mais son mode d'action est inconnu (Faust et Bulla, 1982).
Entérotoxine similaire à <i>B. cereus</i>	Bt produit une entérotoxine similaire à celle de <i>B. cereus</i> qui cause des symptômes de diarrhée. La majorité des souches produit cette toxine en très faible quantité (Perani et al., 1998). Elle est peu caractérisée et les recherches sur sa toxicité indiquent qu'aucun animal en laboratoire n'a présenté jusqu'à maintenant des symptômes associés à l'entérotoxine (Seigel, 2001).
Antibiotiques	Bourque et al. (1992) ont reporté une activité inhibitrice des souches de Bt vis-à-vis des bactéries et des champignons. Schnepf et al. (1998) font mention d'une publication sur les antibiotiques de Bt ayant une activité anti-fongique et d'un brevet sur la synergie d'un antibiotique vis-à-vis l'activité insecticide des CPI. Dans les boues, Mohammedi (2004) a démontré que diverses souches de Bt avaient une activité bactéricide non négligeable. La production d'antibiotiques bactéricides est un mécanisme de défense favorisant la compétition naturelle dans un milieu et les gènes sont présents sur les plasmides. Leur production serait liée à la sporulation et possiblement aux protéases synthétisés durant ce processus.
Chitinases	Plusieurs souches de Bt produisent des chitinases intracellulaires et extracellulaires. Les chitinases brisent les molécules de chitine, un constituant majeur de l'épiderme et de la membrane péritrophique des cellules épithéliales de l'intestin des insectes. La membrane péritrophique recouvre et protège les cellules intestinales. Les chitinases digèrent partiellement cette membrane et les cellules bactériennes, les spores et les toxines la pénètrent plus facilement. Les produits de la chitinase sont dégradés ultérieurement en N-acétylglucosamine par la N-acetylglucosaminidase. Cette enzyme intervient dans l'action insecticide des delta-endotoxines en jouant un rôle dans leur liaison aux récepteurs épithéliales des cellules de l'intestin de la larve (Shahabuddin et Kaslow, 1993 ; Sampson et Gooday, 1998 ; Wiwat et al., 2000).
Protéines insecticides végétatives (PIV)	Bt produit aussi des protéines insecticides durant sa croissance végétative. Jusqu'à maintenant, trois protéines insecticides végétatives (PIV) ont été identifiées, soit les <i>Vip1</i> , <i>Vip2</i> et <i>Vip3</i> (Espinasse et al., 2002). Les PIV se démarquent par leur pouvoir insecticide sur des espèces d'insectes peu sensibles aux delta-endotoxines. Parmi elles, la <i>Vip3A</i> a fait l'objet de plusieurs études. Elle est toxique envers divers lépidoptères tels que le légionnaire d'automne (<i>Spodoptera frugiperda</i>), la noctuelle de la betterave, le ver du tabac (<i>Heliothis virescens</i>) et le ver de l'épi de maïs (<i>Heliothis zea</i>). Elle est spécialement toxique envers le ver gris-noir (<i>Agrotis ipsilon</i>) qui s'attaque à plus d'une cinquantaine de cultures. Selon les études d'Estruch et al. (1996), les gènes codant pour la <i>Vip3A</i> sont exprimés au milieu de la phase logarithmique et durant la phase de sporulation. Elle est sécrétée sous forme soluble par Bt et son poids moléculaire est de 88,6 kDa. Elle peut adhérer aux spores ou aux CPI. Elle peut aussi se localiser dans les fractions cytotolytique et periplasmique de Bt ainsi que dans les inclusions parasporales (Doss et al., 2002). Elle a aussi la particularité d'être synthétisée après l'ingestion des spores de Bt par l'insecte (Donovan et al., 2001). Le mode d'action des <i>Vip3A</i> s'apparente à celui des delta-endotoxines (Yu et al., 1997). Cependant, les symptômes se développent 48-72h après l'ingestion alors qu'ils surviennent 16-24h dans le cas des CPI (Doss et al., 2002). La découverte des PIV est prometteuse pour le marché de Bt. Ces nouvelles protéines insecticides sont susceptibles de contourner les problèmes de résistance des insectes envers les souches traditionnelles de Bt. Jusqu'à maintenant, les recherches sur les PIV portent essentiellement sur leur caractérisation, mais encore aucune information n'est disponible sur les facteurs de régulation stimulant leur production.

2.1.6 Milieux de culture alternatifs pour la production de Bt

En industrie, Bt est produit en fermentation contrôlée dans un milieu liquide stérile contenant de la farine de soja, du glucose, de l'amidon et des sels minéraux. Des cuves en acier inoxydable d'une capacité de dizaines de milliers de litres sont utilisées pour la production en masse de Bt. La fermentation du milieu est effectuée en culture discontinue à 30°C et pH 7. Le débit d'air et la vitesse d'agitation varient selon le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu qui doit être supérieur en tout temps à 20%. Les procédés conventionnels de production de Bt permettent d'obtenir plus de 5×10^9 cellules/ml avec un fort taux de sporulation de 90% dans des conditions optimisées après 24 à 48 heures de fermentation. Rowe et Margaritis (1987, 2004), Lisansky (1993, 1999-2000) ainsi que Bernhard et Utz (1993) ont publié d'excellents documents sur la production de Bt. La formulation de l'insecticide à partir du bouillon fermenté est ensuite effectuée selon les règles de l'art³³.

Pour produire économiquement Bt, le milieu de fermentation doit être abordable et capable de supporter adéquatement la production des CPI (Tirado-Montiel et al., 1998 ; Sachveda et al., 1999a). Tirado-Montiel et al. (1998) ont mis à jour plusieurs produits ou sous-produits qui ont été proposés comme milieu de culture alternatif ou sources de carbone/azote pour la production de Bt. D'autres auteurs ont aussi publié sur le sujet (Alves et al., 1997 ; Yang et Wang, 1998 ; Rojas et al., 1999 ; Sachveda et al., 1999b ; Zouari et Jaoua, 1999 ; Saksinchai et al., 2001). La liqueur de macération du maïs, le lactosérum, les résidus brassicoles de levure ou les farines de poisson sont des exemples de produits de sous-produits agro-alimentaires testés³⁴. Tous les substrats étudiés jusqu'à maintenant sont peu coûteux et certains supportent très bien la croissance, la sporulation et la production des CPI de Bt. Cependant, ils sont restreints à l'échelle locale et leurs frais de transport dissuadent les autres pays à les utiliser (Tirado-Montiel, 1997; Sachveda et al., 1999b ; Saksinchai et al., 2001 ; Vidyarthi et al., 2002). Les boues d'épuration municipales ont été proposées par les chercheurs R.D. Tyagi et J.R. Valéro en raison de leur potentiel nutritif et

³³ Les spores et les CPI du bouillon fermenté sont normalement concentrés par centrifugation. Plusieurs composés sont ensuite ajoutés à l'insecticide pour accroître leur temps de conservation, leur manipulation, leur application, leur performance sur le terrain et leurs effets sur les insectes. Burges (1998) ainsi que Morris et al. (1995) ont mis à jour la liste des additifs ajoutés aux préparations commerciales de Bt. Certains de ces additifs affectent directement les insectes et améliorent indirectement l'entomotoxicité des suspensions. Les mélanges sont finalement mis sur le marché sous forme de suspension, d'émulsion, de poudre sèche, de poudre mouillable ou encore de granules (Lisansky, 1999-2000).

³⁴ Voici d'autres exemples de sous-produits agro-alimentaires qui ont fait l'objet d'études comme milieu alternatif ou sources de carbone/azote (Tirado-Montiel et al., 1998) : endosperme de noix de coco, sous-produit de la production de glutamate de monosodium, fécule de cassave, liqueur de pois, extrait de carotte, extrait de pommes de terre, farine de dattes, écorce de citron, fève de lima, levure de fourrage, lactosérum, sang bovin...

de leur accessibilité. Les boues d'épuration supportent très bien la croissance cellulaire et la sporulation ainsi que la production des CPI et des protéases de Bt. L'innocuité des boues et leur composition variable sont deux considérations à prendre lorsqu'elles sont utilisées comme milieu de culture alternatif. L'innocuité des boues est assurée par : (i) le choix d'une boue dont les constituants chimiques ou organiques potentiellement toxiques (métaux traces, dioxines et furannes...) répondent aux critères de qualité environnementale en vigueur pour l'utilisation bénéfique des boues d'épuration ; (ii) la stérilisation préalable des boues pour éliminer les pathogènes et désactiver les virus³⁵. La composition des boues d'épuration municipales varie selon la saison, les décharges d'effluents des principaux producteurs d'eaux usées et les procédés de traitement des eaux usées utilisés (voir section 4.1.3). Mohammedi (2004) a observé que l'entomotoxicité de Bt pouvait varier dans les boues d'épuration mixtes (mélange de boues primaires et secondaires) en fonction de la saison d'échantillonnage. En fermentation industrielle, il est souhaitable d'utiliser une matière première dont la composition est stable en tout temps afin d'obtenir des rendements similaires d'une production à l'autre. Pour l'instant, des résultats reproductibles sont obtenus lorsque la concentration en solides est contrôlée (étude non publiée). La concentration des solides des boues par centrifugation et l'ajustement subséquent de la teneur en solides seraient une façon de contrôler la variabilité des boues (particulièrement leurs caractéristiques rhéologiques) et d'obtenir des résultats reproductibles d'un échantillon à l'autre.

À l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur les propriétés nutritives et rhéologiques des boues d'épuration pour améliorer le rendement du procédé BT-INRS. Toutefois, la littérature abonde sur les caractéristiques des boues d'épuration ainsi que des méthodes pouvant les modifier afin d'améliorer leur transformation ou, dans des termes plus appropriés au présent projet, d'utiliser leur plein potentiel nutritif pour faciliter leur bioconversion. Une synthèse de cette information est présentée dans la prochaine section.

³⁵ Les cultures de Bt sont très sensibles aux bactériophages et aucune plage de lyse n'a été reportée jusqu'à maintenant après avoir cultivé Bt dans les boues d'épuration (Mohammedi, 2004). Les boues ne favoriseraient pas l'émergence de bactériophages.

2.2 Traitements des boues d'épuration des eaux usées

2.2.1 Constituants des boues d'épuration

Les boues d'épuration sont générés par le traitement des eaux usées municipales (eaux usées domestiques, eaux pluvieuses et nuviales déversées dans les réseaux d'égouts), industrielles (ex. : biosolides de papeteries) ou agricoles (boues biologiques suite au traitement du lisier). La composition des boues dépend de leur origine et du type de traitement des eaux usées qui les génèrent (Krogmann et al., 1997). Dans le cadre du procédé BT-INRS, plusieurs types de boues d'épuration municipales sont testées dont les boues secondaires et les boues épaissies de la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (Québec, Canada) qui ont fait l'objet de nombreuses études. Les boues secondaires sont issues d'un système de biofiltration alors que les boues épaissies proviennent d'un épaisseur gravitationnel de boues recueillant les boues primaires (issues d'une décantation primaire) et les boues secondaires de la station. Les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques de ces deux boues sont différentes. Les boues secondaires contiennent majoritairement des microorganismes morts ou vivants et les boues épaissies contiennent beaucoup plus de matières organiques complexes. À moins d'indication contraire, les notions des prochaines sous-sections portent sur les boues d'épuration d'origine municipale.

Les stations d'épuration des eaux usées municipales traitent normalement les eaux usées domestiques, les eaux pluvieuses et nuviales ainsi qu'une charge d'effluents industriels. Ces eaux sont acheminées vers la station d'épuration via un réseau d'égouts. La proportion d'effluents industriels déversés dans les égouts des municipalités varient d'une station à l'autre. Les boues d'épuration générées par le traitement des eaux usées municipales sont constituées principalement de matière organique et d'eau. Les pourcentages de matière organique et d'eau varient selon le type de traitement des eaux usées qui génèrent les boues. La charge organique provient des excréments humains et d'un mélange complexe de polysaccharides (sucres, cellulose, lignine), d'azote organique (protéines et acides aminés) et inorganique (N-NH_4^+ et N-NO_2^- - NO_3^-), de phosphore organique et inorganique (P-PO_4^{3-}), de graisses (huiles, lipides et acides gras), de métaux ainsi que de matières humiques, fluviatiques et lignocellulosiques. Les composants organiques peuvent être dégradés chimiquement par des procédés abiotiques comme l'hydrolyse, biodégradés ou encore volatilisés (Rogers, 1996). Une forte proportion de ce matériel organique est sous forme de microorganismes morts ou vivants (bactéries, virus, protozoaires ou autres), unicellulaires ou en floccs, et procure une large surface pour l'adsorption des résidus organiques hydrophobes.

L'adsorption de ces composants organiques sur les microorganismes ou les particules des boues peut réduire leur dégradation et les rendre moins accessibles aux microorganismes actifs. D'autres sont associés avec des graisses et des huiles ou contenus dans les particules. Outre la lignine et les acides humiques, les boues contiennent des composés récalcitrants comme les hydrocarbures polyaromatiques et leurs dérivés. Leur masse moléculaire élevée et leur nature hydrophobe compliquent leur dégradation. Mis à part le nickel qui est très soluble, très peu de métaux se retrouvent sous forme dissoute dans les boues. Normalement, ils sont sous forme de sulfites, d'oxydes, d'hydroxydes, de silicates, de phosphates, de carbonates et de sels insolubles. Ils peuvent aussi être adsorbés ou associés à la matière organique des boues (Lombardi et Garcia, 1999). Cette distribution des métaux dépend du pH, de la température, du potentiel d'oxydoréduction ainsi que la présence de ligands et de minéraux (Lake et al., 1984). Finalement, les boues municipales contiennent différentes fractions d'eau dont (Erdincler et Vesilind, 2000): (i) l'eau libre qui peut facilement être retirée par décantation ; (ii) l'eau piégée dans les amas de boues qui être libérée par une force mécanique ; (iii) l'eau attachée aux particules par des forces capillaires ; (iv) l'eau attachée de façon chimique aux particules et qui peut seulement être retirée par des moyens chimiques ou thermiques ou lorsque la particule est brisée (ex. : lyse des cellules microbiennes).

En somme, les boues d'épuration municipales contiennent tous les éléments nutritifs nécessaires à la croissance microbienne (sources de carbone, d'azote et de phosphore, minéraux), mais ils ne sont pas tous sous une forme soluble accessible aux microorganismes. Dans un contexte de bioconversion comme le procédé BT-INRS, il est important que le potentiel nutritif du substrat de fermentation soit utilisé à sa pleine capacité pour obtenir un rendement maximal. L'application de traitement pour hydrolyser et oxyder partiellement les boues d'épuration est donc appropriée.

2.2.2 Effets des traitements

Les traitements des boues d'épuration sont régulièrement utilisés par les municipalités et les industries pour accroître le rendement des procédés biologiques de **stabilisation** (digestion aérobie ou anaérobie) et améliorer la performance des procédés de **conditionnement** avant leur élimination. Les traitements permettent de réduire le temps de rétention des boues d'épuration lors de leur stabilisation. Ils brisent les amas de boues et de microorganismes afin d'en libérer l'eau qui s'y trouve, ce qui facilite leur déshydratation et demande moins d'agents de conditionnement à ajouter. Dans certains cas, les traitements des boues permettent d'améliorer les processus d'enlèvement de l'azote en substituant les sources externes de carbone pour la dénitrification par des boues traitées. Ils permettent aussi d'améliorer les procédés de recyclage de l'azote et du

phosphore (stripage, précipitation) avec la grande quantité de composants dissous dans les boues générées (Müller, 2000). En résumé, les traitements des boues contribuent à minimiser la quantité à gérer et par conséquent les coûts de leur élimination. Il existe différentes catégories de traitements, soit des traitements chimiques, thermiques, mécaniques et biologiques ainsi que plusieurs combinaisons. Les catégories sont énumérées et décrites en détails à l'annexe 3.

Il est mentionné dans la section 1.2.4.2 que la biodisponibilité des éléments nutritifs dans les boues est un facteur important pour le rendement du procédé BT-INRS. Les traitements des boues municipales pourraient être utilisés pour accroître la performance du procédé BT-INRS. L'approche s'apparente à la digestion anaérobie où le degré d'amélioration du procédé par l'hydrolyse des boues est normalement évaluée avec la production de bio-gaz issus de l'activité des microorganismes endogènes. Dans le cas du procédé BT-INRS, le degré d'amélioration pourrait être évaluée par le nombre de spores produites et l'entomotoxicité.

Les particules des boues d'épuration doivent être transformées en forme soluble et facilement biodégradable pour être utilisées convenablement par les bactéries (Aravinthan et al., 2001). La lyse des cellules microbiennes, mortes et vivantes est aussi recherchée pour libérer des produits intracellulaires qui seront utiles à des bactéries de plus grand intérêt dans des traitements ultérieurs (Rocher et al., 1999). Le degré de solubilisation des protéines, des polysaccharides et des lipides dépend du type de traitement appliqué, de la température et de la durée du traitement ainsi que de la concentration en solides et de la fraîcheur des boues. En ce qui concerne les métaux, leur solubilisation dépend du type de traitement et de la durée du traitement, du pH, de la valence des ions métalliques, de la concentration en solides, de leur propre concentration (surtout pour le cuivre et le manganèse), de la concentration d'agents complexants et de la quantité de polymères extracellulaires bactériens (Couillard et Chartier, 1993 ; Wozniak et Huang, 1982). L'hydrolyse et l'oxydation sont deux réactions chimiques à la base des traitements des boues d'épuration.

Outre la disponibilité des éléments organiques et inorganiques, les traitements influencent aussi la biodégradabilité et les propriétés physiques des boues, deux paramètres importants lorsqu'il est question de fermentation. Ils font l'objet des deux prochaines sections. Ensuite, il est question des réactions d'hydrolyse et d'oxydation et de leurs effets sur la disponibilité et la biodégradabilité des éléments ainsi que les propriétés physiques des boues.

2.2.2.1 Biodégradabilité

La biodégradabilité est la qualité d'une substance pouvant être brisée par des microorganismes ou des catalyseurs biologiques en molécules simples réduites ou oxydées. Le niveau de biodégradabilité dépend principalement de la taille des molécules. Les molécules hautement ramifiées sont moins susceptibles à la dégradation que les molécules non ramifiées. Les molécules à courte chaîne ne sont pas aussi rapidement dégradées que les molécules à longue chaîne. De plus, les composés aliphatiques non saturés sont généralement moins accessibles à la dégradation que leurs analogues saturés (Rogers, 1996).

Il est important de bien différencier la solubilisation et la biodégradabilité car des conditions optimales de solubilisation peuvent entraîner la formation de molécules complexes difficiles à dégrader qui empêchent une biodégradabilité optimale (Penaud et al., 1999). Des réactions intramoléculaires peuvent aussi être induites et mener à la formation de composés réfractaires ou complexes. Un bon exemple est le traitement thermique qui peut provoquer des réactions de Maillard ou des réarrangements d'Amadori rendant inaccessibles certains acides aminés et formant des molécules réfractaires colorées comme les mélanoidines (Penaud et al., 1999 ; Yaylan et Huyghues-Despointes, 1994). Il peut aussi générer des acides humiques ou des composés phénoliques suite à la dégradation du matériel lignocellulosique (Pavlostathis et Gosset, 1985).

Dans le cadre de ce travail, les traitements privilégiés sont ceux qui sont susceptibles de fournir des composés solubles biodégradables et de favoriser la production de cellules, de spores et de métabolites secondaires de Bt. Les sections 2.2.2.3 et 2.2.2.4 font mention de ces traitements.

2.2.2.2 Propriétés physiques

Plusieurs propriétés physiques des boues sont importantes dans le secteur de la gestion des boues d'épuration : (i) la concentration, la chimie de surface, la taille et la forme des particules; (ii) les propriétés électrocinétiques ; (iii) la conductivité ; (iv) la rhéologie ; (v) la tension de surface ; (vi) le taux de collision des particules ; (vii) et la stabilité colloïdale. Ces propriétés permettent de : (i) contrôler la mousse générée lors du traitement des boues ; (ii) déterminer les propriétés d'adhérence des boues et leur capacité à être épaissies par voie gravitationnelle ou de flottaison ; (iii) pomper, déshydrater et sécher les boues de façon adéquate (Dentel, 1997). Pour une fermentation comme le procédé BT-INRS, les propriétés physiques des boues peuvent influencer deux paramètres de croissance bactérienne importants, soit le transfert de l'oxygène et le transfert

des éléments nutritifs du milieu aux cellules. Elles peuvent aussi interférer avec l'activité des enzymes.

2.2.2.2.1 Influence sur le transfert de l'oxygène

Le transfert de masse des réactifs de la phase gazeuse ou liquide à travers la phase liquide jusqu'aux bio-catalyseurs (ex. : microorganismes) est très important pour la performance des procédés biologiques (Moo-Young, 1985). Pour expliquer ce phénomène, le transfert de masse de l'oxygène entre les phases gaz-liquide est souvent cité en exemple. Cet élément est un facteur limitant pour les fermentations aérobies comme la production de Bt puisqu'il est essentiel à la formation des produits microbiens désirés. Dans les procédés biologiques, le taux de formation d'un produit comme les CPI de Bt est amélioré en augmentant le taux de transport d'un élément limitant comme l'oxygène. Il est donc important de déterminer les facteurs qui influencent ce phénomène et qui sont plus susceptibles d'être modifiés par l'hydrolyse et l'oxydation des boues.

L'oxygène est habituellement fourni au milieu de fermentation en expulsant des bulles d'air sous des chicanes dans un fermenteur agité. L'oxygène doit franchir plusieurs obstacles pour atteindre les cellules à partir de la bulle d'air, soit l'interface gaz-liquide de la bulle, la région liquide stagnante adjacente à la bulle (ou la cellule), le liquide brut et la membrane cellulaire (Bailey et Ollis, 1986). La force de la résistance des obstacles est déterminée par les facteurs suivants : (i) les caractéristiques hydrodynamiques des bulles et du milieu de culture; (ii) la composition et les propriétés physiques (particulièrement la rhéologie) du milieu ; (iii) le phénomène de l'interface gaz-liquide; (iv) et la densité, l'activité et le type de cellules microbiennes. Ces paramètres influencent de façon globale le taux de transfert de l'oxygène des bulles aux cellules.

Dans les procédés de fermentation aérobie comme le procédé BT-INRS, le coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène ($k_L a$) est un important paramètre pour comparer le transfert d'oxygène des procédés. Plus les valeurs du $k_L a$ sont élevées, meilleurs sont les rendements des procédés biologiques. Lors de la fermentation d'un **milieu non newtonien** comme les boues municipales³⁶, le $k_L a$ varie avec l'intensité de l'agitation, le taux d'aération, la dimension et les caractéristiques hydrodynamiques (formation, bris, coalescence) des bulles d'air, la surface de l'interface gaz-liquide, la rhéologie du milieu de fermentation (densité, viscosité) ainsi que la

³⁶ Dentel (1997) et Slatter (1997) sont deux auteurs qui ont publié des articles sur la rhéologie des boues. Ils mentionnent que les boues d'épuration sont un milieu non newtonien.

géométrie du système (type et position de l'aération, nombre et position des chicanes, volume du bioréacteur...) (Moo-Young, 1985 ; Atkinson, 1991). La formule du taux de transfert de l'oxygène est normalement utilisée pour obtenir les valeurs de $k_L a$. Ce dernier est calculé avec l'Équation 1.

Équation 1 $dC_L / dt = k_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} X$

- Où dC_L / dt = Taux de transfert de oxygène (O_2) ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$)
 C_L = Concentration de O_2 dissous dans le liquide (mmol dm^{-3})
 t = temps (h)
 k_L = coefficient de transfert de masse (cm h^{-1})
 a = aire interfaciale d'échange gaz-liquide par volume de liquide ($\text{cm}^2 \text{ cm}^{-3}$)
 $k_L a$ = coefficient volumétrique de transfert de O_2 (h^{-1})
 C^* = concentration saturée en O_2 dissous selon la pression et la température du liquide
 Q_{O_2} = taux spécifique de consommation de O_2
 X = concentration de la biomasse cellulaire dans le milieu de fermentation
 $Q_{O_2} X$ = taux de consommation de O_2

Parmi tous les facteurs influençant le $k_L a$, celui qui retient l'attention dans ce travail est la **viscosité** du milieu de fermentation. La viscosité du fluide influence grandement le transfert de l'oxygène qui y diffuse. Sa diffusion dans les boues d'épuration est beaucoup plus faible que dans l'eau. La viscosité dans les boues est surtout causée par les polymères extracellulaires (PEC) qui englobent l'eau avec leur structure complexe. Leur bris et leur solubilisation par des réactions d'hydrolyse ou d'oxydation permet de diminuer la viscosité en simplifiant leur structure. Dans le cadre de ce travail, des traitements appliqués sur des boues très concentrées en MES diminueraient leur viscosité afin d'augmenter le taux de transfert de l'oxygène et de maximiser le $k_L a$. De cette façon, le procédé BT-INRS serait en mesure d'utiliser une plus grande quantité de boues et peut-être donner un meilleur rendement en terme de cellules, des spores, d'entomotoxicité et d'activité protéolytique.

2.2.2.2 Influence sur le transfert des éléments nutritifs

Les propriétés physiques des boues d'épuration comme la viscosité et la taille des particules influencent non seulement le transfert de l'oxygène du milieu aux cellules microbiennes, mais aussi celui des éléments nutritifs nécessaires à la croissance, la sporulation et la production des métabolites secondaires de Bt. La performance des procédés biologiques est très influencée par le transport des éléments nutritifs du milieu aux cellules. Le taux de conversion biologique ou de formation d'un produit dans les bioprocédés peut être amélioré en augmentant le taux de transport des éléments nutritifs (Moo-Young, 1995). Le métabolisme bactérien requiert des molécules simples qui sont appropriées aux moyens de transport des éléments nutritifs à travers la cellule. L'assimilation des éléments nutritifs par les cellules se fait en trois étapes : (1) le contact de la cellule avec la molécule; (2) le transport de cette molécule dans la cellule ; (3) et l'utilisation de

cette molécule. Une étape d'hydrolyse est absolument nécessaire si le milieu de fermentation contient des molécules de grande taille et des molécules non stériques incompatibles ou hautement cristallines qui ne peuvent être facilement transportées dans les cellules (Del Borghi et al., 1999). Il est souhaitable d'avoir des particules de très faible taille. Elles ont un rapport surface/volume plus élevé qui offre une plus grande superficie pour la colonisation bactérienne (Masse et al., 2001 ; Hills et Nakano, 1984). De plus, la réduction de la taille des particules par hydrolyse et oxydation partielle favorise leur transport à travers les membranes cellulaires et l'activité enzymatique extracellulaire. Finalement, si les particules sont présentes en grande quantité, elles peuvent exercer une forte pression osmotique qui nuit au fonctionnement des mécanismes de transport cellulaire. Ce phénomène est parfois appelé « l'inhibition par le substrat » (voir la prochaine sous-section).

Dans la littérature consultée, les traitements sont évalués selon leur capacité à augmenter la demande chimique en oxygène (DCO) et/ou la biodégradabilité, mais non selon leur efficacité à diminuer la viscosité du milieu et la taille des particules. Ce travail accorde une attention particulière sur l'efficacité des traitements à atténuer les effets de ces deux paramètres. Un traitement capable de réduire considérablement la viscosité et la taille des particules des boues très concentrées en MES, en plus d'augmenter leur biodégradabilité et leur teneur en éléments nutritifs dissous, serait approprié pour accroître le rendement du procédé BT-INRS.

2.2.2.2.3 Inhibition par le substrat

Les particules présentes dans le milieu peuvent provoquer un phénomène appelé « inhibition par le substrat ». Il s'agit de l'interférence des particules avec l'activité des enzymes excrétées par la bactérie pour dégrader les polymères du milieu de culture. Normalement, une augmentation de la concentration du substrat augmente la vitesse des réactions enzymatiques. Toutefois, quelques enzymes sont sensibles à un excès de substrat. Cela signifie que de grandes quantités de substrats peuvent avoir un effet opposé et ralentir la réaction. Cela peut survenir lorsque deux molécules ciblées se lient au site actif de l'enzyme en même temps (la deuxième molécule approcherait le site actif rapidement après la première). Les deux molécules ne se positionnent pas adéquatement dans le site actif et l'enzyme est incapable de la dégrader ou la modifier. De plus, aussi longtemps que les deux molécules sont fixées sur l'enzyme, cette dernière reste inactive. Généralement, les collisions entre l'enzyme et son substrat sont aléatoires, mais elles sont plus fréquentes lorsque la concentration du substrat augmente. Ainsi, la fréquence que deux molécules se lient simultanément augmente avec la concentration du substrat. D'autres types d'inhibition des enzymes par des composants spécifiques présents dans les boues peuvent survenir : (i) l'inhibiteur compétitif qui

s'attache au site actif l'enzyme et empêche le substrat de s'y lier ; (ii) inhibiteur « incompétitif » qui se lie au complexe enzyme-substrat ; (iii) l'inhibiteur non compétitif qui se lie à l'enzyme et au complexe substrat-enzyme ; (iv) l'inhibition par un produit de la réaction enzymatique qui occupe le site actif de l'enzyme (Pelmont, 1993b). Les particules des boues comme les PEC sont susceptibles de provoquer ces différentes inhibitions selon leur conformité métabolique, leur taille et leur concentration.

Comme il est mentionné dans la sous-section précédente, les particules peuvent interférer avec les mécanismes de transport des éléments nutritifs si elles sont présentes en grande quantité en exerçant une forte pression osmotique sur la cellule. Elles peuvent aussi saturer ou bloquer les transporteurs membranaires, particulièrement s'ils sont de nature enzymatique.

Pour utiliser une plus grande quantité de MES dans le procédé BT-INRS, il est souhaitable de veiller à minimiser le phénomène d'inhibition du substrat sur l'activité enzymatique de Bt. Un traitement des boues capable de diminuer la taille des particules et de générer des molécules compatibles avec le métabolisme de Bt semble approprié pour utiliser des boues très concentrées en MES et accroître le rendement de la bactérie.

2.2.2.3 Hydrolyse

L'hydrolyse (totale) signifie la conversion des molécules lentement biodégradables, par une réaction avec l'eau, en composés de faible poids moléculaire facilement biodégradables comme les acides gras volatils ou AGV. C'est le cas pour les polysaccharides qui sont hydrolysés en sucres simples pour être par la suite transformés en AGV (butyrate, valérate, propionate et acétate). Il en est de même pour les triglycérides qui sont hydrolysés en acides gras à longue chaîne et transformés ensuite en acétate ou propionate par une réaction de β -oxydation (Miron et al., 2000 ; Scheider et al., 2000). Lorsque l'hydrolyse s'effectue à des température élevée, il peut y avoir minéralisation des éléments organiques en CO_2 , H_2O et en éléments inorganiques par des réactions d'oxydation et de gazéification (Shanableh et Jomaa, 2001). Pour leur part, les protéines ou les polyamines sont transformées en peptides, amines, acides aminés, ammoniacque, nitrite et nitrate (Miron et al., 2000 ; Schieder et al., 2000).

Les réactions d'hydrolyse peuvent entraîner la lyse des cellules ou le bris des débris cellulaires. Les PEC contenus à la surface ou à l'intérieur des cellules et des membranes cellulaires sont alors libérés. Ce sont des constituants importants des boues d'épuration. Les auteurs Neyens et al. (2004) ont publié un excellent article sur les PEC. Ce sont des polysaccharides, des polypeptides et des

acides nucléiques. Ils peuvent entre autres piéger l'eau et augmenter la viscosité. Sur la surface des cellules ou des particules organiques, les PEC exhibent des sites négatifs d'adsorption impliqués dans la formation de floccs. Des cations divalents (ex. : Ca^{2+} et Mg^{2+}) peuvent s'y adsorber et lier les particules organiques ensemble. Les acides humiques, les lipides et des hétéropolymères (ex. : glycoprotéines) sont d'autres PEC. Les réactions d'hydrolyse peuvent aussi libérer les PEC adsorbés sur les particules des eaux usées ou des boues d'épuration. En plus des réactions d'hydrolyse, un pH élevé des boues peut provoquer la désorption des PEC par répulsion électrostatique suite à l'augmentation de la charge négative à la surface des particules organiques (Katsiris et Kouzeli-Katsiri, 1987).

Les réactions d'hydrolyse sont souvent utilisées pour traiter la biomasse lignocellulosique (Pandey et Soccol, 2000 ; Pavlostathis et Gosset, 1985 ; Hills et Nakano, 1982) ou pour améliorer les procédés biologiques comme la digestion anaérobie des boues activées (Mata-Alvarez et Llabrés, 2000 ; Chiu et al., 1997 ; Li et Noike, 1992 ; Ray et al., 1990 ; Rajan et al., 1989). Beaucoup d'études ont été réalisées sur l'utilisation de l'hydrolysats des boues d'épuration municipales comme source de carbone pour améliorer la digestion anaérobie des boues d'épuration municipales, la dénitrification ainsi que l'enlèvement du phosphore (Aravinthan et al., 2001 ; Del Borghi et al., 1999 ; Lin et al., 1998 ; Andreasen et al., 1997 ; Tanaka et al., 1997 ; Hatzicinstantinou et al., 1996 ; Barlindhaug et Odegaard, 1996 ; Novelli et al., 1995 ; Aesoy et Odegaard, 1994a ; Aesoy et Odegaard, 1994b ; Karlsson et Goransson, 1993)³⁷. Toutefois, selon la littérature consultée, très peu de recherches ont été effectuées sur l'hydrolyse des boues d'épuration municipales pour en faire une matière première de qualité dans les procédés industriels de fermentation. Pandey et Soccol (2000) ainsi que Laufenberg et al. (2002) ont abordé le sujet sur l'hydrolyse pour la production de PVA, mais les auteurs font référence aux biomasses résiduelles de l'industrie agro-alimentaire. Seuls Odegaard et al. (2002) évoquent la possibilité d'intégrer les boues d'épuration municipales hydrolysés dans une série de traitements visant à produire des bio-fertilisants, de l'énergie et des sources distincts d'éléments nutritifs (carbone, azote et phosphore) dont les marchés sont développés. Cependant, aucune mention n'est faite sur l'utilisation des boues municipales hydrolysées pour produire des PVA comme des agents de biocontrôle ou des enzymes industrielles.

³⁷ Quelques auteurs japonais ont aussi réalisé des travaux sur l'hydrolyse des boues. Kiyohiko et al. (1999) ont utilisé un traitement enzymatique pour traiter des boues de papeteries ainsi que des résidus de poissonnerie afin de s'en servir comme matière première pour la production d'acide lactique. Il est difficile d'avoir accès aux recherches des autres auteurs japonais parce qu'elles sont protégées par des brevets et l'accès aux banques de données est restreint.

Les articles répertoriés indiquent que les réactions d'hydrolyse sont excellentes pour solubiliser partiellement les boues d'épuration municipales et augmenter la performance des procédés biologiques. Elles peuvent être effectuées via des traitements chimiques et physiques ou par diverses combinaisons de ces méthodes. Les prochaines sections abordent les traitements physico-chimiques qui sont étudiés dans ce travail.

2.2.2.3.1 Traitement acide

Le traitement acide solubilise rapidement la matière organique et agit davantage sur les glucides (Aravinthan et al, 2001). Il catalyse entre autres la transformation des molécules renfermant des groupements esters en molécules contenant des groupements alcools et acides carboxyliques (Solomons, 1997). Ce traitement augmente la solubilité du phosphore, du zinc et du fer (Couillard et Chartier, 1993 ; Jenkins et al., 1981 ; Olivier et Carey, 1976). L'hydrolyse acide est effectuée avec du HCl, du H₂SO₄ ou du HNO₃³⁸. Le traitement acide est de moins en moins utilisé pour traiter les boues parce qu'il cause des problèmes de corrosion des équipements et nécessite un procédé de neutralisation (Aravinthan et al., 2001).

Ben Rebah (2001) ainsi que Woodard et Wukasch (1994) sont des auteurs qui ont travaillé sur les traitements acides avec H₂SO₄ pour solubiliser les boues d'épuration³⁹. D'autres auteurs ont combiné le traitement acide (avec H₂SO₄) au traitement oxydant (mélange de O₂ et O₃) pour stabiliser efficacement les boues (Krofta, 1991). Des procédés de traitement acide couplés à un traitement thermique ou oxydant ont déjà été étudiés et sont discutés dans les prochaines sous-sections.

2.2.2.3.2 Traitement alcalin

Le traitement alcalin permet d'hydrolyser la matière organique et de solubiliser efficacement les protéines (Aravinthan et al., 2001). Il provoque diverses réactions dont la modification des groupes carboxyliques libres et la neutralisation de nombreux acides générés par la dégradation des solides dans les boues (Penaud et al., 1999). Souvent, l'hydrolyse catalysée par des agents alcalins

³⁸ Le HNO₃ est rarement utilisé à cause des nitrates qui peuvent s'infiltrer dans le sol ou les eaux lorsque les boues sont enfouies ou utilisées pour l'épandage agricole (Aravinthan et al, 2001).

³⁹ Ben Rebah (2001) a étudié des traitements acides à pH 2, 4 et 6 pour améliorer la croissance de la bactérie *Rhizobium* dans diverses boues. Il a obtenu dix fois plus de cellules bactériennes avec le traitement acide à pH 2. Woodard et Wukasch (1994) ont appliqué un traitement acide aux boues industrielles pharmaceutiques avec H₂SO₄ à la température de la pièce. Ils ont réussi à solubiliser de 50 à 60% des solides en suspension.

engendre des savons et des alcools. Cette réaction est appelée la saponification. C'est le cas notamment de la saponification des graisses (triacylglycérols) qui produit du glycérol et un mélange de sels d'acides carboxyliques à longue chaîne (savons) (Solomons, 1997). Cette réaction s'effectue normalement à hautes températures. Le traitement alcalin est aussi connu pour provoquer le grossissement des particules organiques, ce qui les rend plus susceptible à l'attaque enzymatique (Vlyssides et Karlis, 2004). Certains métaux comme le cuivre et le molybdate sont solubilisés à pH très alcalin (McBride, 1998). La haute solubilité de ces métaux est le résultat de l'hydrolyse des protéines et des polyamines qui forment des complexes avec les métaux électro-négatifs. Ce type de traitement permet aussi de solubiliser efficacement la matière lignocellulosique (Pavlostathis et Gosset, 1985). Mis à part les processus de solubilisation, des phénomènes de désorption surviennent aussi lors de traitement à pH alcalin car des PEC sont libérés des surfaces cellulaires.

Le traitement alcalin est peu coûteux et très populaire (Del Borghi et al., 1999 ; McBride, 1998 ; Novelli et al., 1995). Suite à l'application de ce traitement, il est possible d'utiliser les boues traitées dans des procédés biologiques comme la digestion anaérobie et obtenir de meilleurs rendements en bio-gaz (Chiu et al., 1997 ; Novelli et al., 1995 ; Mukerjee et Levine, 1992). Rajan et al. (1989), Ray et al. (1990) ainsi que Lin et al. (1998) ont montré que le traitement alcalin augmente significativement la solubilisation et améliore la biodégradabilité des boues d'épuration⁴⁰. Aravinthan et al. (2001) ont amélioré la dénitrification des boues activées en ajoutant comme source de carbone des boues ayant subi un traitement alcalin⁴¹. Ben Rebah (2001) est parvenu à accroître le rendement de la bactérie *Rhizobium* lors de la bioconversion des boues d'épuration en bio-inoculant⁴².

Masse et al. (2001) ainsi que Mukherjee et Levine (1992) ont confirmé l'efficacité du NaOH comme agent alcalin pour ce type d'hydrolyse. Le KOH et le Mg(OH)₂ ont aussi été étudiés, mais ils ne donnent pas un aussi bon rendement que le NaOH (Penaud et al., 1999). Chiu et al (1997) ont étudié des combinaisons de traitements incluant l'hydrolyse alcaline et les chercheurs sont

⁴⁰ Rajan et al. (1989) ont montré que le traitement alcalin des boues activées avec le NaOH peut augmenter le niveau de solubilisation jusqu'à 46%. Ray et al. (1990) ont aussi utilisé l'hydroxyde de sodium pour améliorer la digestion anaérobie des boues. Dans leurs travaux, la performance du traitement alcalin est évaluée selon la production de méthane. Cela complique malheureusement la comparaison avec les autres travaux. Lin et al. (1998) ont augmenté la DCO ainsi que la biodégradabilité de boues de l'industrie pétrochimique avec un traitement alcalin utilisant le NaOH.

⁴¹ Leurs travaux sont cependant peu représentatifs parce qu'ils ont été effectués avec des eaux usées synthétiques qui ne se conforment pas à la variabilité potentielle des boues municipales.

⁴² Ben Rebah (2001) a ajouté aux boues de 50 à 200 meq/l de NaOH pour améliorer la croissance de la bactérie *Rhizobium* dans diverses boues d'épuration. Il a obtenu deux fois plus de cellules bactériennes après avoir traité les boues avec 100 meq/l de NaOH.

parvenus à accroître la performance de la digestion anaérobie des boues d'épuration⁴³. Del Borghi et al. (1999) ont aussi étudié ce type de combinaison, mais ils n'ont pas réussi à améliorer la digestion anaérobie⁴⁴.

2.2.2.3.3 Traitement thermique

Le traitement thermique provoque une hydrolyse poussée et une oxydation partielle de la matière organique ainsi qu'une transformation physique des matières colloïdales. À de très hautes températures, il provoque une oxydation complète de la matière. Il brise les particules en molécules à faible poids moléculaire et les membranes cellulaires des microorganismes morts ou vivants (Neyens et Baeyens, 2003 ; Shanableh et Jomaa, 2001 ; Hasegawa, 2000 ; Karlsson et Goransson, 1993). Il augmente la surface totale des particules, ce qui améliore la biodégradabilité. Il est particulièrement intéressant pour la déshydratation des boues car il libère l'eau interstitielle des amas de matière organique/inorganique et de microorganismes (Neyens et al., 2003a). Selon Kepp et al. (2000), la viscosité des boues d'épuration municipales change suite à la libération de l'eau, ce qui permet de manipuler des boues contenant 12% de matière sèche. L'hydrolyse des protéines et des glucides augmente en même temps que la température et la durée du traitement (Delgènes et al., 2000). Dans les boues d'épuration municipales ayant subies un traitement thermique, Li et Noike (1992) ont démontré que les glucides étaient plus aptes à être biodégradés lors de la digestion anaérobie que les protéines et les lipides. Barlindhaug et Odegaard (1996) ont aussi montré que les glucides étaient plus susceptibles à la dégradation que les protéines, celles-ci étant plus solubilisées, alors que les graisses ne sont pas affectées par un tel traitement. Zorpas et al. (2001) ont montré que le traitement thermique influençait considérablement la composition en métaux dans les diverses fractions de boues (échangeable, carbonée, réductible, organique et résiduaire). Plusieurs formes de sulfures des métaux sont converties en oxydes durant le traitement thermique. Le manganèse et le zinc deviennent très biodisponibles après ce type de traitement (Obrador et al., 2001).

⁴³ Chiu et al (1997) ont couplé un traitement ultrasonique (24 sec/ml) à un traitement alcalin (40 meq NaOH/l, 24 h) et solubilisé 89% de la DCO totale de boues activées, ce qui a augmenté considérablement la production d'acides gras volatiles dans un procédé subséquent de digestion anaérobie.

⁴⁴ Del Borghi et al. (1999) ont aussi étudié une combinaison de traitement alcalin et d'hydrolyse bactérienne, mais cette dernière a consommé les sources de carbone et n'a pas amélioré le procédé de digestion.

Le traitement thermique est appliqué sur les boues d'épuration pour faciliter leur digestion anaérobie et améliorer le rendement en bio-gaz (Schieder et al., 2000). Des courtes périodes sont efficaces pour solubiliser les boues (Brooks, 1970 ; Haug, 1977 ; Haug et al., 1978)⁴⁵. Des traitements des boues effectués à des températures supérieures à 200°C décroissent les rendements en méthane lors de la digestion anaérobie. Ce phénomène s'explique par les réactions de Maillard où les sucres réduits réagissent avec les acides aminés pour former des composés nommés « mélanoides ». Les mélanoides sont de couleur brunâtre et contiennent des polymères azotés. Elles sont difficiles à dégrader et parfois inhibitrices. Les réactions de Maillard peuvent avoir lieu à 100°C et s'intensifient à mesure que la température augmente (Müller, 2000)⁴⁶.

L'hydrolyse thermo-alcaline est une combinaison qui améliore de façon considérable le rendement des procédés biologiques pour le traitement des boues résiduelles (Penaud et al., 1999 ; Delgènes et al., 2000)⁴⁷. Vlyssides et Karlis (2004), Tanaka et al. (1997, 2002) ainsi que Novelli et al. (1995) ont amélioré la digestion anaérobie des boues activées par l'hydrolyse thermo-alcaline⁴⁸. Rocher et al. (1999) ont utilisé ce type de traitement pour briser les cellules microbiennes dans les boues activées, ce qui a favorisé la respiration endogène et augmenté la solubilisation des boues⁴⁹.

Divers travaux ont montré que l'hydrolyse thermo-alcaline est très efficace pour traiter les résidus lignocellulosiques (Del Borghi et al., 1999 ; Converti et al., 1997). Elle permet de convertir la

⁴⁵ Haug et ses collaborateurs (1977, 1978) ont solubilisé jusqu'à 70% des solides en suspension dans les boues activées après des traitements entre 100 et 177°C pendant 30 min. Leurs meilleurs résultats étaient obtenus à pH 12. En utilisant ces boues pré-traitées pour la digestion anaérobie, ils ont augmenté les rendements en méthane de plus de 57%. Brooks (1970) a pour sa part solubilisé 20-35% des solides en suspension dans des boues primaires à 170°C durant des périodes de 10-30 min.

⁴⁶ Müller (2000) fait mention d'une publication écrite en langue allemande sur la possibilité que des dioxines soient formées à des températures de 200°C.

⁴⁷ Delgènes et al. (2000) ainsi que Penaud et al. (1999) ont reporté que les conditions optimales pour solubiliser plus de 70% de la DCO dans les boues industrielles sont aux alentours de 140°C pendant 30 à 60 minutes à pH 12 avec l'hydroxyde de sodium. Cependant, les auteurs ne précisent pas exactement le type de boue industrielle utilisé.

⁴⁸ Vlyssides et Karlis (2004) ont étudié la cinétique de l'hydrolyse et la solubilisation des boues à un intervalle intermédiaire de température (50-90°C) et à pH alcalin (8-11) pendant une dizaine d'heures. Selon leurs résultats, La quantité de COD dans les boues est accrue, le pourcentage de solides volatiles totaux diminue et la production de méthane s'intensifie en augmentant la température et le pH de l'hydrolyse (particulièrement à 90°C et pH 11). Tanaka et al. (1997, 2002) ont amélioré la digestion anaérobie des boues activées en autoclavant préalablement les boues à 130°C pendant 5 min avec 0,3 g de NaOH / g de solides volatiles en suspension. Toutefois, comme certains auteurs (Ray et al., 1990; Haug, 1977), ils présentent leurs résultats selon la quantité de méthane produite ou de réduction de la DCO après digestion, ce qui rend difficile la comparaison avec les résultats présentés par d'autres auteurs selon les changements de la DCO après les traitements. De leur côté, Novelli et al. (1995) ont traité les boues activées avec de l'hydroxyde de sodium à des températures aux environs de 100°C et ont augmenté considérablement la solubilisation de la DCO. Del Borghi et al. (1999) ont aussi étudié l'hydrolyse thermo-alcaline, mais ils ont ajouté une étape d'hydrolyse bactérienne qui a plutôt consommé les sources de carbone sans améliorer la digestion anaérobie.

⁴⁹ Selon leurs travaux, les conditions optimales pour induire le bris des cellules et obtenir une excellente biodégradabilité sont une température de 60°C à pH 10 pendant 20 minutes en utilisant l'hydroxyde de sodium.

structure résistante cristalline de la cellulose en cellulose amorphe ou de défaire les liens de la lignine en clivant les ponts glycosidiques. Cette modification augmente l'aire de la surface disponible pour l'attaque enzymatique et la diffusion des enzymes dans la structure complexe.

Selon les expériences de Neyens et al. (2003a) sur l'hydrolyse thermo-alkaline, le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ est le plus efficace des agents alcalins testés (NaOH , KOH , $\text{Mg}(\text{OH})_2$) en terme de diminution de la quantité de boues résiduelles et d'amélioration de la déshydratation⁵⁰. Stuckey et McCarty (1979) ont par contre obtenu de meilleures solubilisations avec le NaOH ⁵¹.

Le traitement thermique peut également être effectué à pH acide. Karlsson et Göransson (1993) ont réussi de cette façon à accélérer la dénitrification des boues activées ainsi que leur déshydratation⁵². D'autres chercheurs ont accru la performance de la digestion aérobie des boues d'épuration (Singh et Patterson, 1974)⁵³. Plusieurs auteurs ont réalisé des traitements thermo-chimiques avec de l'acide sulfurique pour améliorer le conditionnement des boues d'épuration (Smith et Göransson, 1992 ; Neyens et al., 2003b)⁵⁴.

Pour en connaître davantage sur les traitements thermiques, le lecteur est invité à consulter les articles de Neyens et Baeyens (2003) et de Neyens et al. (2003a et b). Les auteurs font entre autres mention de plusieurs procédés testés à grande échelle.

2.2.2.4 Oxydation partielle et totale

Le traitement oxydant est un moyen de stabiliser les boues en vue de leur conditionnement et/ou de leur élimination. Ce traitement est parfois utilisé pour traiter les eaux usées qui contiennent des éléments inhibiteurs à la croissance des microorganismes impliqués dans des traitements subséquents. Il améliore notamment la biodégradabilité des eaux usées en transformant les composés organiques toxiques potentiellement présents dans la matière organique (ex.: les

⁵⁰ Les meilleurs résultats sont obtenus à 100°C et pH 10 pendant 60 minutes.

⁵¹ Les auteurs sont parvenus à solubiliser 54-55% de la DCO avec l'hydroxyde de sodium à 175-200°C

⁵² Les auteurs ont hydrolysé les boues à 150°C et à pH < 4 en ajoutant de l'acide sulfurique (2 à 3 m³ de boues étaient traitées à l'heure) afin de solubiliser les métaux. Ils ont ensuite effectué un traitement alcalin avec du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pour précipiter et récupérer les métaux. Finalement, ils ont alimenté un procédé de boues activées avec les boues hydrolysées. L'enlèvement de l'azote dans les boues activées a augmenté et les boues résiduelles pouvaient être déshydratées efficacement en absence de polymères.

⁵³ Singh et Patterson (1974) ont solubilisé jusqu'à 70% des solides en suspension des boues à 121°C pendant 5 h avec l'acide sulfurique.

⁵⁴ Smith et Göransson (1992) ont utilisé des températures de 150-160°C pendant 1 h alors que Neyens et al. (2003b) ont utilisé de 120-160°C durant la même période de temps pour obtenir des boues avec une siccité de plus de 60%.

composés chlorophénoliques) en composés organiques biodégradable. De plus, il dissout efficacement la majorité des métaux. Lorsqu'un composé organique toxique réagit avec un agent oxydant, diverses réactions surviennent (Neyens et al., 2003c ; Bowers et al., 1989):

- La structure de la molécule peut changer et le composé devient assimilable par les microorganismes. Ceci s'applique également aux molécules à la surface des amas de matière organique et de microorganismes ;
- Dans le cas d'une oxydation partielle, la molécule organique se dégrade partiellement et sa toxicité est réduite. L'hydrolyse précède toujours l'oxydation partielle. Il est possible aussi que cette oxydation génère des molécules réfractaires à la biodégradation ;
- Dans le cas d'une oxydation totale, la molécule organique est complètement détruite en CO_2 , H_2O et éléments inorganiques. Il est question alors de gazéification et de minéralisation de la matière.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un agent oxydant très efficace et nécessite des ions Fe^{2+} ou Fe^{3+} comme catalyseur. Il provoque la formation de radicaux libres qui peuvent réagir avec divers composés organiques récalcitrants ou non réfractaires. De nombreuses applications utilisant du H_2O_2 sont connues pour enlever les polluants des eaux usées comme les sulfites, les hypochlorites, les nitrites et les chlorines. L'oxygène (O_2) et l'ozone (O_3) sont deux autres agents oxydants. Les rayons ultraviolets peuvent également générer des radicaux libres en interagissant avec H_2O_2 , O_2 et O_3 (Jeworski et Heinzle, 2000). Plusieurs auteurs dont Kim et Huh (1997) décrivent en détails les réactions redox avec le fer communément appelées les réactions de Fenton. D'autres métaux de transition comme le cuivre ou le manganèse peuvent être utilisés car ils peuvent partager les paires électrons de l'oxygène. Des radicaux libres sont formés et peuvent réagir avec plusieurs molécules organiques comme l'hémicellulose, la cellulose ou autres polysaccharides. Ces réactions avec les polysaccharides sont plus efficaces à des pH très acides (Mustranta et Viikari, 1993). La température, le temps et le pH de la réaction ainsi que la concentration en réactifs (H_2O_2 , Fe^{2+} ou Fe^{3+}) sont des facteurs très importants pour le traitement oxydant avec le H_2O_2 (Neyens et al., 2003c)⁵⁵. Si la concentration des réactifs n'est pas limitante, les molécules organiques sont totalement oxydées.

⁵⁵ Dans les travaux réalisés par Neyens et al. (2003c) sur l'étude pilote d'un procédé d'oxydation des boues par l' H_2O_2 , l'ajout de 1.67 g Fe^{2+} /kg de boues sèches et 25 g H_2O_2 /kg de boues sèches (réaction à température ambiante, 60-90 min) ont oxydé totalement plus de

Kim et Huh (1997) ont montré que l'oxydation de type Fenton augmente la biodégradabilité des lixiviats provenant d'un site d'enfouissement qui n'avait pas été géré convenablement. Mustranta et Viikari (1993) ainsi que Camacho et al. (2002) ont augmenté la DCO des boues activés avec un traitement oxydant⁵⁶. Ahn et al. (2002) ainsi que Weemaes et al. (2000) ont quant à eux utilisé une dose d'ozone pour solubiliser les boues d'épuration et en minéraliser une partie⁵⁷. Ahn et al. (2002) ont ensuite recyclé la fraction solubilisée des boues ozonées comme source de carbone pour la dénitrification alors que Weemaes et al. (2000) ont transféré les boues ozonées dans un digesteur anaérobie pour augmenter de plus de 40% la production de méthane.

Des combinaisons de traitements physico-chimiques avec le traitement oxydant sont aussi possibles. Selon les travaux de Jeworski et Heinzle (2000), il est préférable d'appliquer le traitement oxydant après un traitement chimique ou biologique pour éliminer les composés réfractaires. Les expériences menées par Narkis et Shneider-Rotel (1980) ont suggéré que l'application d'un traitement oxydant après un traitement alcalin puisse transformer les molécules réfractaires en composés contenant des groupements hydroxyles ou carboxyliques biodégradables. Ces auteurs ont comparé la DBO et la DCO après différents traitements. Cependant, le traitement oxydant était effectué avec de l'ozone. Or, cet élément est susceptible d'éliminer les produits biodégradables générés durant ce même traitement. Kim et al. (2000) ont utilisé du NH_4OH et du H_2O_2 pour traiter les boues de papetières. Cette combinaison a permis une dépolymérisation rapide de la lignine. Mukherjee et Levine (1992) ont également étudié la combinaison de ces deux traitements en les effectuant simultanément. Cette combinaison n'a pas donné de bons résultats, probablement parce que la réaction oxydante n'avait pas été effectuée à pH acide. Finalement, Anderson et al. (2002) ont réalisé des traitements oxydants à température élevée et ambiante afin d'améliorer la déshydratation des boues d'épuration⁵⁸.

20% des solides totaux et de la matière organique. Les auteurs suggèrent que la réaction se fasse à pH 3 puisque les ions Fe^{2+} sont instables à des pH au-dessus de 4 et les ions Fe^{3+} formés à ces pH précipitent en hydroxide de fer sans être recyclés en ions Fe^{2+} .

⁵⁶ Mustranta et Viikari (1993) ont augmenté de 30 à 40% la DCO des boues activés avec un traitement oxydant. La réaction oxydante a été effectuée à 70°C et pH 3 pendant 2 heures dans un bain-marie rotatif (60 tours par min) avec 15 à 30 mmoles de H_2O_2 par litre de boues. Camacho et al. (2002) ont ajouté jusqu'à 0,49 g H_2O_2 /g de solides totaux, à une température de 95°C, pour réduire de 60-65% la DCO de boues activées. La durée était d'une heure, mais aucune information n'est fournie sur le pH de la réaction.

⁵⁷ Ahn et al. (2002) ont utilisé 0.5g O_3 /g de boues sèches pour minéraliser 20% des boues et en solubiliser 50%. Weemaes et al. (2000) ont minéralisé 16% du carbone organique total et augmenté de 30% la DCO soluble des boues avec une dose de 0.1 O_3 /g de DCO.

⁵⁸ Les chercheurs ont entre autres appliqué un traitement oxydant à 145°C avec 15 mg de fer / g de boues sèches et 10 mg de H_2O_2 /g de boues sèches. En terme de déshydratation, les traitements oxydants à température ambiante et les traitements thermiques sans l'ajout d'oxydant ont donné de meilleurs résultats.

2.2.3 Récapitulation sur les traitements

Les hydrolyses acide, alcaline et thermo-alcaline ainsi que les traitements oxydants améliorent la biodégradabilité des boues d'épuration. Les réactions d'hydrolyse et d'oxydation partielle sont plus ou moins définies dans la littérature, mais elles interviennent au niveau de la biodisponibilité des éléments nutritifs (en termes de solubilité, de simplicité, de conformité métabolique vis-à-vis l'activité enzymatique et le transport à travers la membrane bactérienne, et de concentration). Ces traitements sont susceptibles d'améliorer les procédés biologiques de traitement ou de conversion des boues dont la performance dépend entre autres de la disponibilité des éléments nutritifs et de la biodégradabilité. L'application d'une hydrolyse thermique suivi d'un traitement oxydant partiel est aussi intéressante. Les composés inhibiteurs ou réfractaires de l'hydrolyse thermique seraient susceptibles d'être éliminés par le traitement oxydant.

À l'exception des publications de Pandey et Soccol (2000), Laufenberg et al. (2002) et Odegaard et al. (2002), aucun travail sur l'hydrolyse et l'oxydation partielle dans un contexte de fermentation des boues d'épuration municipales en PVA n'a été reportée dans la littérature. Quant aux publications sur la digestion aérobie et anaérobie, il est question de procédés biologiques qui utilisent régulièrement des boues d'épuration municipales hydrolysées pour accroître leur rendement en PVA (AGV et/ou méthane). Cependant, ils sont appliqués dans un contexte de traitement des boues d'épuration, et non dans une perspective industrielle et commerciale comme c'est le cas pour le procédé BT-INRS.

Il y a donc intérêt à étudier l'effet de l'hydrolyse et de l'oxydation partielle sur le rendement du procédé BT-INRS et les propriétés des boues d'épuration municipales. De telles recherches contribueront certainement au développement des connaissances sur la production de PVA dans des substrats de fermentation peu communs. Ces recherches instaureront une étape de traitement en amont des boues d'épuration utilisés comme matière première dans les fermentations industrielles.

CHAPITRE 3: BUT ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

3.1 But du projet

Le procédé BT-INRS initiera une nouvelle tendance dans le secteur industriel des bioconversions en proposant une matière première universelle et économique dont le potentiel nutritif permet la production de produits microbiens d'intérêt commercial. Cette technologie environnementale confèrera à son ou ses acquéreurs une situation privilégiée dans la production de Bt et un biopesticide efficace à un coût mondialement compétitif. De plus, le procédé BT-INRS permettra de percer le fructueux marché des protéases alcalines. Toutefois, avant sa commercialisation, il est important de maximiser le rendement du procédé en développant de nouvelles stratégies qui augmentent le nombre de spores, l'entomotoxicité et l'activité protéolytique de Bt dans les boues d'épuration. La biodisponibilité des éléments nutritifs dans les boues et la concentration en MES sont deux facteurs à considérer pour le développement des futures stratégies.

*Le but du présent travail est de développer une stratégie qui utilise le plein potentiel nutritif des boues afin d'accroître le rendement de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 produit dans les boues d'épuration.* Le rendement est évalué par le nombre de cellules et de spores produites ainsi que l'entomotoxicité et l'activité protéolytique du milieu de culture fermenté.

3.2 Hypothèses de travail

Le chapitre 1 fait l'état de deux problèmes majeurs qui sont susceptibles de limiter le rendement du procédé BT-INRS :

- La faible disponibilité des éléments organiques et inorganiques (en termes de concentration, solubilité, de simplicité, de conformité métabolique vis-à-vis l'activité enzymatique et le transport à travers la membrane bactérienne) dans les boues d'épuration qui ne permettrait pas à Bt de produire des spores, des protéases alcalines et des facteurs de virulence tels que les CPI au maximum de sa capacité ;
- La difficulté d'utiliser des boues d'épuration plus concentrées en MES pour mettre à la portée de Bt une plus grande quantité d'éléments nutritifs, ce qui permettrait la production d'un plus

grand nombre de cellules, de spores, de protéases alcalines et de facteurs de virulence tels que les CPI.

Le chapitre 1 soulève aussi une interrogation quant à la production de PVA plus performants dans les boues d'épuration :

- Est-ce que les propriétés nutritives des boues d'épuration municipales stimulent la production de spores et de CPI plus actifs (en terme d'entomotoxicité) et/ou la surproduction des produits entomotoxiques de Bt autres que les spores (delta-endotoxines, enzymes, PIV, etc.)?

Selon la revue de littérature présentée dans le chapitre 2, des facteurs importants pour la production de Bt dans les boues ont été identifiés :

- La biodisponibilité des éléments organiques ou inorganiques (en termes de concentration, de solubilité, de simplicité et de conformité métabolique) impliqués dans l'activation des systèmes de production et la formation de spores, de CPI et de protéases alcalines ;
- La concentration en oxygène dissous et son transfert dans le milieu pour la croissance, la sporulation et la production des CPI et de protéases alcalines ;
- La complexité du milieu de culture susceptible d'influencer la maturation des spores, la formation complète des CPI et l'expression génétique des produits entomotoxiques de Bt.

La revue de littérature mentionne également des points importants sur le traitement des boues en rapport avec les facteurs importants pour la production de Bt mentionnés précédemment :

- Les traitements acides, alcalins, thermiques et oxydants améliorent la performance des procédés biologiques de traitement des boues tels que la digestion aérobie/anaérobie, la dénitrification et l'enlèvement du phosphore ;
- Les traitements solubilisent partiellement les boues par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation, ce qui améliore la disponibilité et la concentration des éléments organiques et inorganiques ;
- Les traitements diminuent la taille des particules et la viscosité des boues, ce qui atténue leurs effets restrictifs sur le transfert de l'oxygène et des éléments nutritifs aux cellules ainsi que le phénomène de l'inhibition par le substrat.

En tenant compte de ces considérations, deux hypothèses sont posées :

- 1) L'hydrolyse (acide, alcaline, thermique), l'oxydation partielle (avec H₂O₂) et la combinaison de traitements peuvent accroître le rendement de Bt var. *kurstaki* HD-1 cultivée dans les boues d'épuration municipales (en termes de cellules et spores produites, d'entomotoxicité et d'activité protéolytique) et permettre l'utilisation d'une plus grande concentration de boues (en terme de matière en suspension).
- 2) Les boues d'épuration municipales, en tant que substrat de fermentation, stimulent la formation des produits microbiens entomotoxiques de Bt var. *kurstaki* HD-1 (spores, cristaux, protéases, chitinasés, protéines insecticides végétatives, autres protéines connues ou inconnues) qui sont plus actifs en terme de pouvoir insecticide, et provoquent leur surproduction.

3.3 Objectifs de recherche

Ce travail comporte deux objectifs spécifiques de recherche :

- 1) **Traitement des boues d'épuration** : Trois traitements chimiques (acide, alcalin, oxydant), deux traitements thermiques (pH neutre, pH alcalin) et une combinaison de traitement (thermique suivi d'une oxydation) sont appliqués aux boues secondaires et mixtes d'origine municipale avant leur fermentation par Bt var. *kurstaki* HD-1.
 - 1.1) Essais préliminaires : Des expériences préliminaires sont réalisées en fioles Erlenmeyer pour déterminer les meilleurs traitements à appliquer aux boues à l'étude parmi les techniques de traitements suggérées.
 - 1.1.1) *Sélection des meilleurs traitements* : Pour chacun des traitements, deux concentrations de matières en suspension sont étudiées (25 g/l et 35 g/l). Les meilleurs traitements sont évalués selon l'augmentation de l'entomotoxicité de Bt.
 - 1.1.2) *Effets des traitements sur la composition des boues d'épuration* : L'effet des traitements à l'étude sur les caractéristiques physico-chimiques des boues est aussi étudié afin de déceler le ou les facteurs responsables de la diminution et/ou de l'augmentation du rendement de Bt.
 - 1.2) Optimisation : Les conditions optimales des meilleurs traitements sélectionnés seront déterminées en fioles Erlenmeyer.

- 1.2.1) *Planification des expériences* : Une méthode statistique expérimentale est utilisée pour planifier les expériences d'optimisation en fioles Erlenmeyer.
- 1.2.2) *Analyse des résultats* : Les résultats sont analysés avec une méthode statistique pour déterminer les conditions optimales des meilleurs traitements et évaluer la reproductibilité et la signifiante statistique des résultats.
- 1.2.3) *Validation des conditions optimales* : Les conditions optimales des meilleurs traitements sont vérifiées dans des expériences en fioles Erlenmeyer et dans des expériences en fermenteur de 15 L.
- 2) **Évaluation de l'entomotoxicité des spores, des cristaux et des facteurs de virulence solubles de Bt var. *kurstaki* HD-1** : Quelques facteurs de virulence de Bt HD-1 (spores, CPI et produits solubles) sont soumis à des bio-essais pour en évaluer l'entomotoxicité. Les spores et les CPI sont purifiés et testés. Le bouillon fermenté est centrifugé. Le surnageant, contenant les produits solubles potentiellement entomotoxiques (enzymes, PVI, autres protéines), est récolté et testé. Le culot, contenant les débris cellulaires, les spores et les CPI, est également récolté et testé. Les entomotoxicités des produits de Bt obtenus dans le milieu conventionnel à base de soja, dans les boues traitées et dans les boues non traitées sont comparées.

Si les objectifs sont atteints et que les hypothèses sont confirmées, la stratégie préconisée sera intégrée au procédé BT-INRS comme une étape de traitement en amont des boues d'épuration. Ce travail se démarque des autres études réalisées dans le secteur des fermentations parce qu'il étudie le potentiel des boues d'épuration à devenir une matière première pour la production de PVA (agents de biocontrôle, bio-fertilisants, enzymes industrielles, bio-plastiques...) et met en valeur son potentiel nutritif encore sous-estimé. Aucune recherche n'a été réalisée à ce jour sur l'hydrolyse et l'oxydation partielle des boues d'épuration municipales pour en faire un substrat bon marché de qualité dans les procédés industriels de fermentation. Actuellement, les recherches s'accroissent sur les microorganismes génétiquement modifiés et la manipulation des milieux de culture synthétiques pour accroître le rendement en produits microbiens, mais aucun travail n'a démontré la capacité des boues à stimuler la production ou la surproduction de produits microbiens plus performants. Ce travail fournira de nouvelles connaissances en bioconversion et sera une référence pour le développement de procédés de production de PVA qui utilisent les biomasses résiduelles comme substrat de base. Ce travail contribuera donc à faire des boues d'épuration d'aujourd'hui une source alternative d'approvisionnement pour demain.

CHAPITRE 4: MÉTHODOLOGIE

4.1 Boues d'épuration des eaux usées municipales

4.1.1 Échantillonnage

Les boues épaissies ou « mixtes » et secondaires sont échantillonnées à la Station d'épuration Est de la Ville de Québec (Québec, Canada), anciennement la Communauté Urbaine de Québec (CUQ). Les boues mixtes sont un mélange de boues primaires (60%), issues de la décantation primaire des eaux usées traitées, et de boues secondaires (40%), issues d'un procédé de biofiltration des effluents primaires⁵⁹. Les boues de la station sont dirigées dans des épaisseurs gravitationnels et elles sont recueillies pour les expériences dans des bidons propres de 20 litres par pompage⁶⁰. Après l'échantillonnage, les boues sont rapidement entreposées à 4°C. En raison de leur faible concentration en MES, les boues secondaires sont décantées à 4°C pendant 1-2 jours. La partie décantée est ensuite recueillie dans d'autres bidons propres de 20 L. Les boues décantées sont conservées à 4°C pour un maximum de trois semaines avant leur fermentation. La composition des boues est analysée la semaine suivant leur échantillonnage.

4.1.2 Analyse des caractéristiques physico-chimiques des boues

Les paramètres suivants sont analysés sur les boues échantillonnées : les solides totaux (ST), les solides volatils totaux (SVT), les matières en suspension (MES), les matières volatiles en suspension (MVES), l'azote total (N_t), l'ammonium ($N-NH_4^+$), le phosphore total (P_t), le carbone total (C_t), le carbone organique total (COT) et dissous (COD) et les teneurs totales en divers éléments inorganiques (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, S et Zn). Pour des expériences spécifiques, la biodégradabilité, le contenu en protéines dissoutes et les éléments inorganiques en phase soluble sont aussi analysés. Les méthodes utilisées pour analyser les

⁵⁹ Les eaux usées sont d'abord pré-traitées avec 4 dégrilleurs et 5 déssableurs avant de passer dans 7 décanteurs lamellaires. L'effluent des décanteurs primaires passe ensuite à travers 30 biofiltres gravitaires (Van Collie et al., 2004). Le lavage des biofiltres génère une eau de lavage qui est acheminée vers des décanteurs. Les matières en suspension de l'eau de lavage décantée constituent les boues secondaires.

⁶⁰ Les ports de lunettes de protection, d'une chienne, de gants et d'un masque sont de mise lors de l'échantillonnage. Tout étudiant qui échantillonne les eaux usées et les boues d'épuration est préalablement vacciné contre le tétanos ainsi que les hépatites A et B.

caractéristiques physico-chimiques des boues sont indiquées dans le Tableau 5. L'erreur des méthodes ou la justesse des appareils utilisés sont également présentées dans ce tableau.

Tableau 5 Méthodes utilisées pour l'analyse des caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration.

Caractéristiques	Méthode utilisée
ST	Séchage des échantillons à 105°C et mesure de la masse sèche (APHA et al., 1989) avec une balance <i>Mettler PM460 Deltarange</i> de Mettler Toledo Canada (Canada). L'erreur de la méthode a été évaluée à 12%.
SVT	Séchage des ST à 550°C et mesure de la masse sèche (APHA et al., 1989).
MES	Centrifugation des échantillons à 8000 tours par minute pendant 15 min. à l'aide d'une centrifugeuse <i>Sorvall RC-S5 Plus superspeed centrifuge</i> de DuPont (É.-U.), filtration du surnageant avec une pompe à vide en utilisant un filtre 934AH de Whatman (É.-U.), séchage du filtrat à 105°C et mesure de la masse sèche (APHA et al., 1989). L'erreur de la méthode a été évaluée à 13%.
MVES	Séchage des MES à 550°C et mesure de la masse sèche (APHA et al., 1989).
C _t et N _t	Séchage des échantillons, broyage et analyse avec un analyseur d'azote-carbone-soufre <i>Leco CHNS-932</i> de Leco Corporation (É.-U.) selon la méthode d'analyse du C _t dans les sédiments (applicable aux boues d'épuration) accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1986). La justesse de l'appareil est évaluée à 2%.
COT et COD	Analyse avec un analyseur <i>TOC-5000A</i> de Shimadzu Co. (Tokyo, Japon) selon le protocole fourni par le manufacturier. Pour le COD, le protocole est le même, mais l'échantillon est préalablement centrifugé (8000 tours par minute, 15 min), filtré (pompe à vide, filtre 934AH de Whatman) et le filtrat est ensuite analysé. La justesse de l'appareil est évaluée à 2%.
N-NH ₄ ⁺	Centrifugation des échantillons (8000 tours par minute, 15 min.), filtration du surnageant (pompe à vide, filtre 934AH de Whatman) et analyse du filtrat avec un auto-analyseur <i>Lachat Quickchem FIA+ 8000series</i> de Lachat Instruments (É.-U.) selon les protocoles fournis par le manufacturier. La justesse de l'appareil est évaluée à 0,5%.
Contenu en protéines dissoutes	Centrifugation des échantillons (8000 tours par minute, 15 min), filtration du surnageant (pompe à vide, filtre 934AH de Whatman) et analyse du filtrat par la méthode colorimétrique de Bradford (1976) en utilisant l'ensemble pour l'analyse des protéines solubles de Bio-Rad no.500-0001 (Ontario, Canada) et un spectrophotomètre de type <i>Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer</i> de Varian (É.-U.).
Biodégradabilité	La biodégradabilité des boues se mesure généralement par la DBO, mais cette analyse est laborieuse et exige un équipement spécifique qui n'est pas disponible dans le laboratoire de l'INRS-ETE. Dans ce travail, elle est plutôt mesurée en évaluant la concentration en MES et en MVES après une période d'incubation de 5 jours (Benmoussa et al., 1997). Dans le cas des boues ayant subies un traitement, elles sont inoculées avec 5% (v/v) de boues fraîches pour évaluer la biodégradabilité suite au traitement avec cette méthode. L'erreur de la méthode n'a pas été mesurée.
P _t et autres éléments inorganiques (Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, S, Zn)	- Analyse des teneurs totales : Digestion des échantillons selon la méthode de digestion des boues d'épuration accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989) et analyse du lixiviat avec un spectromètre à émission de plasma <i>Vista Ax CCO Simultaneous ICP-AES</i> de Varian (É.-U.) selon le protocole fourni par le manufacturier. - Analyse des teneurs dans la phase soluble : Le protocole est le même, mais l'échantillon est préalablement centrifugé (8000 tours par minute, 15 min.), filtré (pompe à vide, filtre 934AH de Whatman) et ensuite analysé.

* nd = non déterminé.

4.1.3 Composition des boues

Les caractéristiques physico-chimiques des boues utilisées dans ce travail sont présentées dans le Tableau 6. Les données brutes sont disponibles à l'Annexe 6. Les concentrations en ST et en MES varient selon les manipulations faites aux boues (ex. : décantation par gravité et/ou concentration par centrifugation pour obtenir la concentration en MES désirée). Avant les manipulations, les boues mixtes contiennent entre 2,0% et 5,0% de ST et de MES alors que les boues secondaires en

contiennent de 0,1% à 1,5%. Les concentrations en ST et en MES des boues analysées sont disponibles à l'Annexe 6.

Tableau 6 Composition des boues mixtes et secondaires de la Station d'épuration Est de la Ville de Québec (Québec, Canada).

Caractéristiques ^a	Teneurs moyennes - Boues mixtes				Teneurs moyennes - Boues secondaires				GVMRF ^b	
	n	Moy.	S	Variation (%)	n	Moy.	S	Variation (%)	C1	C2
C _t (mg C/kg)	6	376000	8000	2,1	8	380000	40000	11		
N _t (mg N/kg)	6	34000	9000	27	8	60000	10000	17		
Ratio C:N	6	12	2	17	8	6,5	0,9	14		
COT (mg C/kg) ^c	6	60000	20000	33	7	80000	30000	38		
N-NH ₄ ⁺ (mg N/kg)	6	5000	2000	40	8	12000	11000	92		
N-org. (mg N/kg)	6	28000	10000	36	8	50000	10000	20		
Al (mg/kg)	4	15000	14000	93	7	20000	10000	50		
Ca (mg/kg)	4	20000	1000	5,0	7	16000	7000	44		
Cd (mg/kg)	4	1,1	0,6	55	7	1,4	0,9	64	3	10
Cr (mg/kg)	4	50	40	80	7	60	40	67	210	1060
Cu (mg/kg)	4	440	90	21	7	200	100	50	400	1000
Fe (mg/kg)	4	8000	7000	88	7	12000	7000	58		
K (mg/kg)	4	20000	10000	50	7	6000	3000	50		
Mg (mg/kg)	4	8000	4000	50	7	3000	2000	67		
Mn (mg/kg)	4	300	100	34	7	150	60	40		
Mo (mg/kg)	4	10	2	20	7	5	2	40	5	20
Na (mg/kg) ^c	4	70000	60000	86	6	30000	10000	33		
Ni (mg/kg)	4	20	8	40	7	14	9	64	62	180
P _t (mg/kg)	4	12000	1000	8,3	7	10000	4000	40		
Pb (mg/kg) ^{c, d}	3	4	1	25	6	30	10	33	150	300
S (mg/kg) ^c	3	6000	2000	33	7	8000	7000	88		
Zn (mg/kg)	4	1500	500	33	7	600	400	67	700	1850

^a Les teneurs moyennes sont présentées sur une base de boue sèche (mg/kg de boue sèche). Les teneurs en COT et N-NH₄⁺ sont calculées avec la concentration en solides totaux (ST) des échantillons (mg/kg de solides totaux). Les teneurs en C_t et N_t sont calculées avec la masse de l'échantillon analysée (environ 1 g). Les teneurs en éléments inorganiques sont calculées avec la masse de l'échantillon digéré, soit 0,25 g. La teneur moyenne en N-organique est calculé en soustrayant la valeur de N-NH₄⁺ à celle du N_t. La teneur moyenne en N-organique contient celle en N-NO_x (non mesurée) qui est négligeable dans les boues de la Ville de Québec (entre 5 et 20 mg N/kg).

^b Teneurs limites des contaminants chimiques dans les boues d'épuration pour leur utilisation bénéfique selon les critères de qualité environnementale (catégorie C) dans le Guide de valorisation des matières résiduelles fertilisantes (GVMRF) du Ministère de l'environnement du Québec (MENV, 2004). Les teneurs en As, Co, Se, Hg et dioxines/furanes sont d'autres contaminants chimiques réglementées dans les critères C1 et C2 du GVMRF. Elles n'ont pas été mesurées dans ce travail, mais elles répondent en tout temps aux critères C1 selon les données de la Ville de Québec.

^c Moyenne et écart type après l'élimination des valeurs aberrantes décelées par le test de Grubbs ($p < 0,05$). Boues mixtes : valeur aberrante pour S (50000 mg/kg) et Pb (32 mg/kg). Boues secondaires : valeur aberrante pour COT (200000 mg/kg), Na (100000 mg/kg) et Pb (100 mg/kg).

^d La teneur en plomb dans les boues mixtes est très basse. Sur les 4 boues testées, une seule avait une concentration raisonnable de 32 mg/kg, les 3 autres ayant une teneur inférieure à 5 mg/kg. Vidarthi et al. (2002) avaient observé une valeur de 56 mg/kg pour la teneur du plomb des boues mixtes de la Ville de Québec.

Les teneurs en C_t et N_t varient peu dans les boues mixtes et secondaires. En revanche, les teneurs en COT, en $N-NH_4^+$ et en éléments inorganiques montrent des variations importantes dans les deux types de boues, à l'exception du Ca, Cu, Mo et P_t dans les boues mixtes. Les facteurs pouvant expliquer ces variations sont énumérés à l'Annexe 6.

Malgré les variations observées, les teneurs en Cd, Cr, Ni, Pb et Zn respectent en tout temps les critères de qualité environnementale C1 du GVMRF pour leur épandage sur les sols agricoles ou sylvicoles. La teneur en Mo se situe dans la catégorie C2 dans les deux boues. Quant au Cu, sa teneur se situe dans la catégorie C2 pour les boues mixtes. Ces boues ne représentent aucun danger pour l'environnement si les contraintes d'épandage et les bonnes pratiques agro-environnementales sont respectées.

4.2 Traitements des boues d'épuration

4.2.1 Valeurs initiales des variables expérimentales de chaque traitement

Les variables expérimentales étudiées de chaque traitement se limitent seulement à quelques valeurs. Les valeurs initiales choisies ne reflètent pas l'étendue des possibilités, mais elles servent de base pour sélectionner les traitements qui augmentent le rendement de Btk HD-1 (chapitre 5). Ce travail tient compte de cette considération et utilise une planification expérimentale (plan composite centré) pour explorer le nombre considérable de possibilités et déterminer les valeurs optimales de chaque variable (chapitre 6).

Pour tous les traitements, le choix des variables expérimentales et de leurs valeurs initiales s'est fait selon les publications scientifiques citées dans la revue de littérature du chapitre 2 malgré que les études en question n'aient pas été effectuées dans un contexte de production de Bt.

Lors des expériences préliminaires (chapitre 5), quelques variables expérimentales sont étudiées à différentes valeurs alors que d'autres conservent la même valeur. Dans le cas des expériences d'optimisation (chapitre 6), toutes les variables expérimentales sont étudiées à différentes valeurs.

Il y a une variable commune à tous les traitements étudiés. Il s'agit de la concentration en MES. Les expériences préliminaires sur les traitements sont conduites avec seulement deux concentrations en MES, soit 25 et 35 g/l. Pour les expériences d'optimisation, elles couvrent plusieurs valeurs de MES entre 25 et 45 g/l.

Si nécessaire, la concentration en MES des boues est ajustée par dilution⁶¹ ou par concentration dans une centrifugeuse *Sorvall RC-S5 Plus superspeed centrifuge* de DuPont (É.-U.) (8000 tours par min pendant 15 min à 4°C). Après centrifugation, les boues concentrées sont homogénéisées dans un homogénéisateur *Commercial Blender CB-2-10* en acier inoxydable de Waring (Torrington, É.-U.) pendant 10 sec. Leur concentration en MES est ensuite mesurée. En se basant sur la nouvelle concentration en MES, les boues sont diluées pour obtenir la concentration désirée.

4.2.2 Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide des boues est effectuée en ajustant la valeur initiale du pH à $2,0\pm 0,1$ et $4,0\pm 0,1$ avec une solution 4N de H₂SO₄. Les boues sont placées dans un incubateur *Sanyo orbital incubator* de Sanyo Gallenkamp (Royaume-Uni) à une température de 30°C et une agitation de 200 tours par minute pendant 24h (sans contrôle de pH). Ensuite, le pH est réajusté à $7,0\pm 0,1$ avec une solution 2N de NaOH et les boues ensuite stérilisées à 121°C pendant 30 min dans un autoclave *Sanyo Labo-Autoclave* de Sanyo (Japon).

4.2.3 Hydrolyse alcaline

L'hydrolyse alcaline des boues est effectuée en ajustant le pH initial à des valeurs de $10,0\pm 0,1$ et $12,0\pm 0,1$ avec une solution 4N de NaOH. Entre 0,064 et 0,114 gramme de NaOH par gramme de MES sont ajoutés aux boues pour atteindre les différents pH⁶². Les boues sont placées dans un incubateur *Sanyo orbital incubator* de Sanyo Gallenkamp (Royaume-Uni) à 30°C et 200 tours par min pendant 24 h (sans contrôle de pH). Ensuite, le pH est réajusté à $7,0\pm 0,1$ avec une solution 2N de H₂SO₄ et les boues sont autoclavées à 121°C pendant 30 min.

4.2.4 Hydrolyse thermique

4.2.4.1 Petits volumes

L'hydrolyse thermique de faibles volumes de boue est effectuée dans un digesteur à micro-onde *Multiwave-microwave sample preparation system* de Perkin Elmer et Paar Physica (É.-U.). Les

⁶¹ Le surnageant de la même boue, après centrifugation, était utilisé pour la dilution.

⁶² Environ 40 meq NaOH 4N / litre pouvaient être ajoutés à des boues ajustées à 25 g MES/l et 100 meq dans des boues ajustées à 35 g MES/l.

boues hydrolysées de cette façon sont utilisées pour les expériences en fioles Erlenmeyer (Pyrex®). Les hydrolyses sont effectuées à une température de 140°C et 180°C pendant 30 min à pH 7,0±0,1 et 10,0±0,1. Après le traitement, le pH est réajusté à 7,0±0,1 avec une solution de H₂SO₄ 4N ou de NaOH 4N et les boues sont stérilisées à 121°C durant 30 min. Notons que les expériences préliminaires sur l'hydrolyse alcaline ont été effectuées avant celles sur l'hydrolyse thermique. L'hydrolyse alcaline à pH 10 a donné d'excellents résultats (section 5.1). C'est pourquoi cette valeur de pH a été retenue pour les expériences préliminaires sur l'hydrolyse thermique. Dans les prochaines sections, l'hydrolyse thermique à pH alcalin est nommée « hydrolyse thermo-alcaline ».

4.2.4.2 Grands volumes

L'hydrolyse thermique de grands volumes de boue est conduite dans un hydrolyseur en acier inoxydable spécialement conçu pour le présent travail par la compagnie EBR (Québec, Canada). Le volume de travail est approximativement de 10 litres. Une photographie de l'hydrolyseur est présentée à la Figure 3.

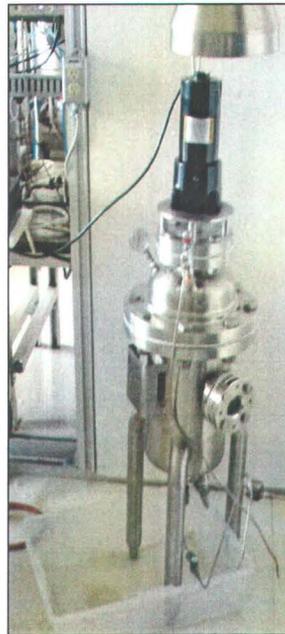


Figure 3 Hydrolyseur de 10 litres conçu par EBR (Québec, Canada).

L'hydrolyse se fait par l'injection directe de vapeur pure dans les boues. L'hydrolyseur est également équipé d'un agitateur pour agiter les boues durant leur hydrolyse. La vitesse d'agitation utilisée était de 80 tours par min. Le suivi de la température est réalisé avec un baromètre et une liste de conversion appropriée. Le contrôle de la température est fait manuellement en fermant et en

ouvrant la valve régissant l'entrée de la vapeur dans l'hydrolyseur. Les boues hydrolysées par injection de vapeur étaient utilisées pour les expériences en fermenteur de 15 litres. Afin de travailler à la concentration en MES désirée en fermenteur avec des boues hydrolysées, les boues sont concentrées avant l'hydrolyse puisqu'elles subissent un effet de dilution par la vapeur injectée⁶³. Après chaque hydrolyse, les MES sont mesurées. Les valeurs des paramètres d'hydrolyse thermique en hydrolyseur sont celles déterminées avec les expériences d'optimisation en fioles Erlenmeyer.

4.2.5 Traitement oxydant

Le traitement oxydant est effectué en ajoutant 0,01, 0,03 et 0,05 ml de peroxyde d'hydrogène (30%v/v) par gramme de MES dans les boues dont le pH a préalablement été ajusté à $3,0 \pm 0,1$ avec une solution 2N de H_2SO_4 . Les boues sont ensuite placées dans un bain-marie *360 Orbital Shaker Bath* de Precision Scientifics (É.-U.) à $70^\circ C$ et 60 tours par min pendant 2h (sans contrôle de pH). Le pH des boues est ensuite réajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution 2N de NaOH et les boues sont stérilisées à $121^\circ C$ pendant 30 min.

4.2.6 Hydrolyse thermique et traitement oxydant

Les deux traitements sont effectués selon les mêmes protocoles décrits précédemment. Le traitement oxydant est réalisé après l'hydrolyse thermique. Deux concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été testées : 0,01 et 0,03 ml de H_2O_2 (30%v/v) par gramme de MES. À la fin des deux traitements, le pH des boues traitées est réajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution 2N de H_2SO_4 ou de NaOH. Les boues sont finalement stérilisées à $121^\circ C$ durant 30 min avant leur fermentation. Pour les prochaines sections, cette combinaison de traitements est nommée « traitement thermo-oxydant ».

⁶³ Selon un essai avec de l'eau distillée à $140^\circ C$, le volume initial augmente de 15% après 30 min. Avec des boues secondaires contenant 35 g MES/l, le volume initial augmente de 55% après une hydrolyse de 30 min à $140^\circ C$. Ces observations ont été prises en considération pour le calcul de la concentration en MES initiale et du volume initial de boues à hydrolyser.

4.3 Production de *Bacillus thuringiensis*

4.3.1 Souche bactérienne à l'étude

La souche bactérienne utilisée dans ce travail est la souche HD-1 du sérovar *kurstaki* de *Bacillus thuringiensis*. Elle provient de la collection du Service canadien des forêts (SCF) de Ressources naturelles Canada situé à Sainte-Foy (Québec, Canada).

4.3.2 Culture de départ et inoculum

La culture de départ est fabriquée à partir d'une colonie isolée de Btk HD-1 cultivée sur une gélose tryptique soja (GTS) (Quelab, Canada) qui est inoculée dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml (Pyrex®) contenant 100 ml de bouillon tryptique soja (Quelab, Canada) stérile⁶⁴. La culture de départ est placée dans un incubateur *Sanyo orbital incubator* de Sanyo Gallenkamp (Royaume-Uni) à 30°C et 200 tours par min pendant 8h. La pureté de la culture de départ est vérifiée au microscope à contraste d'interférence différentielle *Axioplan* de Zeiss (Allemagne) avec un grossissement total de 1600X, par la technique d'étalement sur gélose, un test de la catalase et une coloration de Gram⁶⁵.

L'inoculum est préparé en déposant 2 ml (2% v/v) d'une culture de départ dans des fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de boues mixtes ou secondaires stériles⁶⁶ pour les adapter à leur milieu de fermentation. La concentration en MES des boues est préalablement ajustée à 25 g/l. Les fioles sont ensuite placées dans un incubateur *Sanyo orbital incubator* de Sanyo

⁶⁴ La procédure pour la stérilisation du bouillon ainsi que tous les autres milieux de culture mentionnés dans les prochaines sections est la suivante : après avoir ajusté le pH à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution 2N de NaOH, le milieu de culture est stérilisé à 121°C pendant 15 min dans un autoclave *Sanyo Labo-Autoclave* de Sanyo (Japon). Pour les boues, la durée de stérilisation est de 30 min.

⁶⁵ Voici la procédure pour vérifier la pureté de la culture de départ : (i) première vérification de la morphologie des cellules (bâtonnet) dans le bouillon fermenté (et de la présence de coques ou autres contaminations) au microscope à contraste d'interférence différentielle *Axioplan* de Zeiss (Allemagne) avec un grossissement total de 1600X ; (ii) étalement de plusieurs dilutions du bouillon fermenté selon la technique d'étalement sur gélose (milieu GTS) pour vérifier la morphologie des colonies bactériennes isolées (et de la présence de coques ou autres contaminations) ; (iii) une colonie isolée sur un plat de Pétri fait l'objet d'une seconde vérification au microscope à contraste d'interférence différentielle pour ensuite subir une coloration de Gram et finalement un test de la catalase. La présence d'une seule forme cellulaire (bâtonnet), un seul type de colonies bactériennes (beige, forme ronde, élévation convexe basse, contour légèrement ondulé sur milieu GTS), une réaction positive à la coloration de Gram et au test de la catalase permettent de conclure raisonnablement que la culture de départ est pure et qu'il s'agit de bactérie du genre *Bacillus*. Si des spores ovales ou des cristaux réfractiles (à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules) sont observés au microscope à contraste d'interférence différentielle, il est possible de conclure raisonnablement la présence de cellules de l'espèce *Bacillus thuringiensis*.

⁶⁶ La présence de contamination après stérilisation des boues est vérifiée au microscope à contraste d'interférence différentielle *Axioplan* de Zeiss (Allemagne) avec un grossissement total de 1600X et par la technique d'étalement sur gélose (milieu GTS) sur plusieurs dilutions de la boue stérile.

Gallenkamp (Royaume-Uni) à 30°C et 200 tours par min pendant 12h. La pureté de l'inoculum est vérifiée selon la même procédure utilisée pour vérifier la pureté de la culture de départ.

Lors des expériences avec le milieu commercial conventionnel à base de soja pour la production de Bt⁶⁷, la procédure est la même pour la fabrication de l'inoculum.

4.3.3 Expériences en fioles Erlenmeyer

Un volume de 100 ml de boues mixtes ou secondaires stériles est utilisé pour les expériences en fioles Erlenmeyer de 500 ml. Chaque fiole est inoculée avec 2 ml (2% v/v) de l'inoculum approprié. Ensuite, elles sont placées dans un incubateur *Sanyo orbital incubator* de Sanyo Gallenkamp (Royaume-Uni) à 30°C et 200 tours par min pendant 48h. Le nombre d'échantillonnage varie selon les expériences. Pour chaque échantillonnage, 0,5 ml de boues est recueilli et déposé dans un tube de verre contenant 4,5 ml de NaCl 0,85% (v/v) pour débiter la série de dilution qui servira à dénombrer les cellules et les spores viables⁶⁸. Le premier tube de la série de dilution contient 1 gramme de billes de verre stériles (5 mm de diamètre) pour séparer les cellules et les spores des particules en suspension des boues par agitation au vortex. Après 48h, environ 4 ml de boues sont conservés à -20°C dans une bouteille en plastique Nalgène stérile de 8 ml contenant 1 g. de billes de verre (5 mm de diamètre). Ces échantillons sont utilisés pour les tests de toxicité.

4.3.4 Expériences en fermenteur

Les expériences en fermenteur sont réalisées dans des fermenteurs en acier inoxydable de 15 litres de Biogénie (Québec, Canada) équipés d'unités de contrôle pour la température, le pH, l'aération et l'agitation⁶⁹. Une photographie du fermenteur est présentée à la Figure 4.

⁶⁷ Selon Lisansky et al. (1993), la composition du milieu commercial à base de soja est la suivante (g/l): farine de soja (15), dextrose (5), amidon (5), K₂HPO₄ (1), KH₂PO₄ (1), MgSO₄·7H₂O (0,3), FeSO₄·7H₂O (0,02), ZnSO₄·7H₂O (0,02) et CaCO₃ (1). Lors de sa préparation, le dextrose et le magnésium de sulfate sont stérilisés séparément des autres ingrédients. Le pH du milieu est ajusté à 7,0±0,1 avec une solution de H₂SO₄ (2N) ou de NaOH (2N) avant la stérilisation.

⁶⁸ Un aliquot de l'échantillon dilué est aussi utilisé pour vérifier la pureté de la culture au microscope à contraste d'interférence différentielle. La présence de cellules végétatives ayant une forme de bâtonnet et/ou de spores et de cristaux permet de conclure raisonnablement qu'il s'agit d'une culture pure de Bt. Le dénombrement des cellules et des spores permet aussi de vérifier la présence de contamination dans le milieu de culture.

⁶⁹ Les unités de contrôle sont connectées à ordinateur et les paramètres de fermentation étaient contrôlés à l'aide du logiciel *FIX Version 5.5* de Intellution (É.-U.).

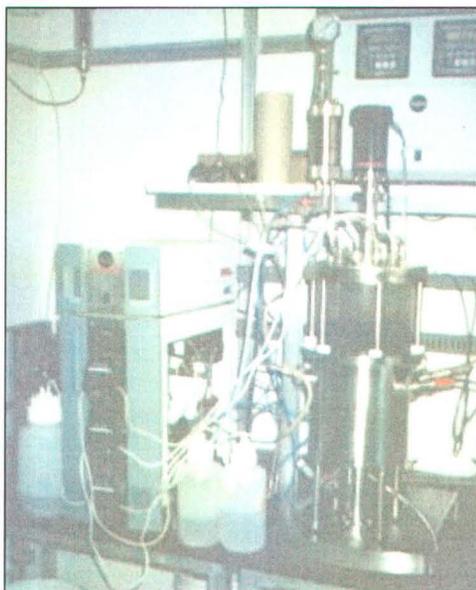


Figure 4 Fermenteur de 15 litres (volume de travail de 10 litres) de Biogénie (Québec, Canada).

Avant d'entamer la stérilisation et la fermentation des boues, l'électrode polarographique de pH de Mettler-Toledo (É.-U.) est calibrée en utilisant des solutions tampons de pH 4 et pH 7 (VWR-Canlab, Canada). Un volume de travail de 10 litres de boues est utilisé pour chaque expérience. Du polyéthylène glycol (Sigma, Canada) est ajouté aux boues (0,2% v/v) pour minimiser la formation de mousse durant leur stérilisation. Les boues sont directement stérilisées dans le bioréacteur à 121°C pendant 30 min après avoir ajusté le pH à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution de H_2SO_4 (2N) ou de NaOH (2N)⁷⁰. Le pH est réajusté à $7,0 \pm 0,1$ de façon aseptique avant l'inoculation. Les boues sont inoculées de façon aseptique avec 200 ml d'inoculum (2% v/v). Durant la fermentation, le pH est maintenu à $7,0 \pm 0,2$ avec du H_2SO_4 (2N) et du NaOH (2N). Pour contrôler le pH, l'injection d'acide ou de base s'effectue automatiquement ou manuellement par des pompes péristaltiques *Masterflex* de Cole-Parmer Instruments Inc. (Canada). Le niveau d'aération et l'agitation varient entre 2-7 litres d'air par min et 300-600 tours par min afin de conserver plus de 20% d'oxygène dissous (OD) dans le bioréacteur. Le pourcentage en OD dans le milieu de fermentation est mesuré avec une sonde *InPro 6000* de Mettler Toledo (É.-U.). Le contrôle de la mousse s'effectue manuellement ou automatiquement avec un brise-mousse mécanique et une solution de polyéthylène glycol 20% (v/v) (Sigma, Canada). Les données de pH et de OD sont recueillies à chaque 6 sec par des

⁷⁰ Comme pour l'inoculum, la présence de contamination après stérilisation des boues ou du milieu soja est vérifiée au microscope à contraste d'interférence différentielle *Axioplan* de Zeiss (Allemagne) avec un grossissement total de 1600X et par la technique d'étalement sur gélose (milieu GTS) sur plusieurs dilutions du milieu de culture.

analyseurs numériques *Rosemount Analytical Model 1054A* de Rosemount Analytical Inc. (É.-U.). La durée de chaque expérience est de 48h. Des échantillons sont récoltés à chaque 3h pendant 24h et à chaque 6h jusqu'à la fin de l'expérience. Le nombre d'échantillonnage peut varier selon les expériences. De 10 à 20 ml sont recueillis aseptiquement dans un tube de verre stérile avec 1 gramme de billes de verre (6 mm de diamètre) pour le dénombrement de cellules et de spores viables⁷¹. Pour les temps 30h, 36h et 48h, une partie de l'échantillon (4-6 ml) est conservée à -20°C dans une bouteille en plastique Nalgène stérile de 8 ml contenant 1 g. de billes de verre (5 mm de diamètre) pour les tests de toxicité et de l'activité protéolytique.

4.3.5 Paramètres expérimentaux

4.3.5.1 Cellules et spores viables

Pour chaque échantillon, le dénombrement des cellules et spores viables (comptes totaux) est effectué par la technique de comptage en plaque (APHA et al., 1989). Des dilutions successives des échantillons sont effectuées dans une solution stérile de NaCl 0,85% (p/v). Les trois dernières dilutions sont étalées en triplicata sur des boîtes de GTS et incubées à 30°C pendant 16h dans un incubateur *Sanyo incubator* de Sanyo Gallenkamp (Royaume-Uni). La même méthode est appliquée pour le dénombrement des spores, à l'exception que les dilutions utilisées pour les comptes totaux sont chauffées à 70°C pendant 15 min dans un bain-marie *Thermo-Lift* de Buchler Instrument (É.-U.) avant d'être étalées. Le dénombrement des unités formatrices de colonies (UFC) est effectué sur les boîtes de Pétri contenant 30-300 colonies (>1 mm). Le nombre de cellules viables est calculé en soustrayant le nombre de spores viables aux comptes totaux. Les comptes sont rapportés en cellules et/ou spores viables par ml. L'erreur de la méthode d'étalement a été évaluée à 8% pour les comptes totaux et le dénombrement des spores viables.

4.3.5.2 Entomotoxicité

Le potentiel entomotoxique de Btk HD-1 est estimé par des bio-essais sur des larves de 3^{ième} âge de la tordeuse des bourgeons de l'épinette de l'est (Lepidoptera : *Choristoneura fumiferana*) selon la méthode d'incorporation dans la diète de Dulmage et al. (1971). La préparation commerciale 76B FORAY® de Abbott Laboratories (Chicago, É.-U.) est utilisée comme standard pour l'analyse de

⁷¹ Comme pour les expériences en erlenmyers, un aliquot de l'échantillon dilué est aussi utilisé pour vérifier la pureté de la culture au microscope à contraste d'interférence différentielle. Le dénombrement des cellules et des spores permet aussi de vérifier la présence de contamination dans le milieu de culture.

l'entomotoxicité. Un régime alimentaire stérile est utilisé pour l'élevage et la croissance des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) (McMorran, 1965). La composition du régime alimentaire est disponible à l'Annexe 6. Les larves de *C. fumiferena* proviennent du SCF de RNCAN situé à Sault-Ste-Marie (Ontario). Les bio-essais des expériences préliminaires ont été effectués sur des larves de *C. fumiferena* (chapitre 5). En raison de la contamination par des virus du lot principal de *C. fumiferena* du SCF, les bio-essais des autres expériences ont été conduits sur des larves de la TBE de l'ouest (Lepidoptera : *Choristoneura occidentalis*) dont la vulnérabilité envers les éléments entomotoxiques de Btk HD-1 est sensiblement la même que *C. fumiferena*⁷². Elles sont également fournies par le SCF de Sault-Ste-Marie.

L'échantillon et le standard sont préalablement dilués et les trois dernières dilutions sont normalement utilisées pour l'analyse de l'entomotoxicité. Un millilitre de chaque dilution est mis dans 20 ml de régime alimentaire stérile (Division des forêts, Ministère des Ressources Naturelles du Québec) contenant 1,5% d'agar stérile (p/v) (Sigma, Canada). Après avoir bien agité, 1 ml du mélange est rapidement déposé dans des tubes de verres de 15x45 mm (VWR Canlab, Canada) dont les bouchons de plastiques sont finement percés. Les tubes et les bouchons sont soigneusement nettoyés et stérilisés à l'autoclave (pour les tubes) et aux rayons ultra-violet (pour les bouchons). Un groupe de 20 tubes est utilisé pour chaque dilution. Un groupe de 25 tubes est utilisé pour le blanc, chacun de ces tubes contenant seulement 1 ml de régime alimentaire stérile gélifié. Un second groupe de 25 tubes est utilisé pour un contrôle négatif dans lequel les tubes contiennent 1 ml de l'échantillon de boues stériles utilisées pour les expériences en question⁷³. Cet échantillon de boue est stérile. La dilution effectuée pour ce contrôle correspond au plus faible facteur de dilution des échantillons testés (soit la première des trois dernières dilutions). Sur une surface propre et à proximité d'une flamme pour minimiser les problèmes de contamination par des moisissures en laboratoire, une larve est déposée délicatement dans chacun des tubes avec un pinceau propre et très fin. Tous les tubes sont placés à la température de la pièce en présence d'une source de lumière (lampe avec une ampoule 60W dans ce cas-ci) durant le jour et la nuit. Une photographie des tubes à bio-essai est présentée à la Figure 5.

⁷² Une expérience a été réalisée pour comparer les résultats sur les larves de *C. occidentalis* avec un lot de larves de *C. fumiferena* provenant exceptionnellement de la Division des forêts du Ministère des Ressources Naturelles du Québec. Le bio-essai indiquait que les larves de *C. occidentalis* étaient légèrement plus sensibles (<20%) que celles de *C. fumiferena*.

⁷³ Les contrôles négatifs étaient des boues stériles non fermentées, leur surnageant ou leur culot après centrifugation. Dans la majorité des cas, le pourcentage de mortalités observé dans les contrôles négatifs étaient inférieurs ou équivalents au témoin (diète seulement). Lorsque le pourcentage de mortalités s'élevait au-dessus de 10%, cela était aussi observé pour le témoin et le bioessai n'était pas valide.

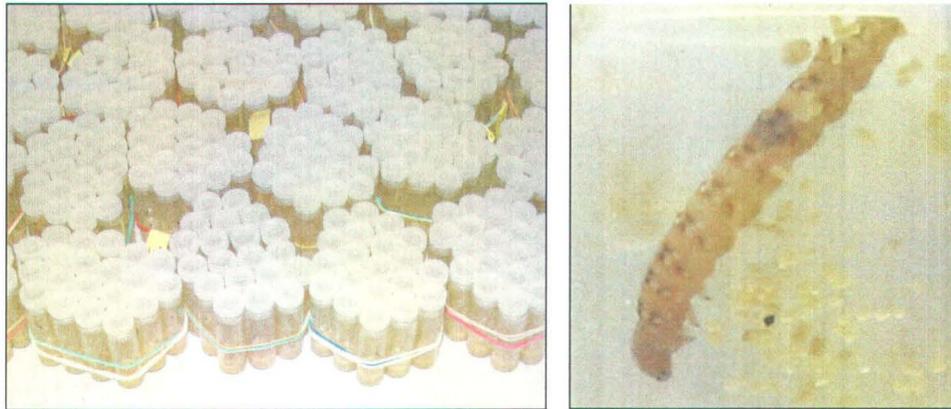


Figure 5 Bioessai pour évaluer l'entomotoxicité de Btk HD-1 sur les larves de la TBE.

Les pourcentages de mortalité sont calculés à chaque jour après 7 jours⁷⁴. L'entomotoxicité est évaluée en comparant les pourcentages de mortalité des dilutions des échantillons avec les mêmes dilutions du standard dont la valeur de l'entomotoxicité est connue. Ce calcul s'inspirent des travaux de Dulmage et al. (1971) qui proposent de diviser la concentration létale pour éliminer 50% de la population associée à l'échantillon par celle du standard et de multiplier le résultat par la valeur connue de l'entomotoxicité du standard. La formule pour le calcul de l'entomotoxicité est présenté à l'Équation 2 :

Équation 2
$$\frac{((\% \text{mort.1:9} / \% \text{mort.std.1:9}) + (\% \text{mort.1:99} / \% \text{mort.std.1:99}) + (\% \text{mort.1:999} / \% \text{mort.std.1:999}))}{3} \times \text{Entomotox. Foray} = \text{Entomotox.}$$

Où %mort.1:9 = mortalités observées avec l'échantillon dilué 1:9
 %mort.std.1:9 = mortalités observées avec le standard Foray 76B dilué 1:9
 Entomotox. = Entomotoxicité exprimée en UI/μl
 Entomotox.Foray = Entomotoxicité du Foray exprimée en UI/μl

Les valeurs de l'entomotoxicité sont reportées en unités internationales par microlitre (UI/μl). Les dilutions 1:9, 1:99 et 1:999 sont cités en exemple dans l'Équation 2. Normalement, les dilutions 1:999, 1:9999 et 1:99999 des échantillons de boues ou de milieu commercial fermentés sont testées. L'erreur de la méthode a été évaluée à 7%.

⁷⁴ Après sept jours, si des larves dont la taille identique est au premier jour sont toujours vivantes, elles sont considérées comme mortes. Elles ont évité la diète contenant les produits microbiens toxiques de Btk. Les larves sont devenues malades après s'être nourries de la diète. Les effets sous létaux des produits microbiens de Btk sont responsables des troubles intestinaux des larves malades. Ce phénomène corrobore avec l'immobilisation de la larve à l'extrémité du tube sous le capuchon et l'absence de fèces et de soie. Comme ces larves ne se nourrissent plus, elles sont destinées à mourir. Certains auteurs font part de ce phénomène de répulsion dans leurs travaux (Burges et al., 1976; Gould et al., 1991). Plusieurs auteurs tels que Morris et al. (1996) tient compte de ce phénomène lors des comptes. Dans ce travail, l'expérimentateur a pris en considération ce phénomène lors du compte des mortalités.

4.3.6 Autres mesures expérimentales

Cinq autres paramètres sont mesurés : le taux de croissance, le coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène, la viscosité, la taille des particules et l'activité protéolytique. Les quatre premiers sont mesurés uniquement lors des expériences en fermenteur (chapitre 6). Quant à l'activité protéolytique, elle est mesurée lors des expériences en fermenteur ainsi que les essais de validation en fioles Erlenmeyer pour tester les conditions des traitements optimisés (chapitre 6).

4.3.6.1 Taux de croissance

Le taux de croissance spécifique (μ) est analysé pour évaluer l'influence des traitements sur la croissance de Btk HD-1 dans les boues. Le μ est calculé avec le temps de génération (t_g) qui correspond au temps requis pour que le nombre de cellules (N_0) augmente de deux fois ($2N_0$). Le t_g est obtenu avec la pente (m) de la phase exponentielle de croissance préalablement dessinée à la main sur papier millimétrique. L'Équation 3 est normalement utilisée pour calculer μ .

$$\text{Équation 3} \quad m = (\log N_{t1} - \log N_{t2}) / (t_2 - t_1) = \mu \rightarrow \ln 2N_0 - \ln N_0 = \mu \times t_g \rightarrow \mu = 0,693 / t_g$$

Pour l'ensemble des expériences en fioles Erlenmeyer, le peu de points sur la courbe de croissance (cellules viables par ml en fonction du temps) rend impossible le calcul du taux de croissance spécifique. C'est pourquoi le calcul du taux de croissance spécifique est seulement réalisé pour les expériences en fermenteur.

4.3.6.2 Le coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène

Le coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène ($k_L a$) est analysé pour évaluer la performance de la production de Btk HD-1 dans les boues traitées et non traitées. Le $k_L a$ est calculé par une méthode dynamique qui requiert uniquement une sonde pour l'oxygène dissous (Moo-Young, 1985). Basée sur la balance dynamique de l'oxygène en milieu discontinu, l'Équation 4 (section 2.2.2.2.1) est réarrangée de la façon suivante :

$$\text{Équation 4} \quad C_L = C^* - 1 / k_L a \times (Q_{O_2} X + dC_L / dt)$$

$Q_{O_2} X$ est calculé en premier lieu. Pour se faire, la valve d'aération est complètement fermée et les valeurs de l'oxygène dissous sont récoltées à chaque 10 sec. Lorsque le niveau de l'oxygène dissous atteint 30%, la valve est réouverte et les valeurs sont recueillies à chaque 10 sec jusqu'à ce que l'oxygène dissous se stabilise. Lorsque l'aération est arrêtée, l'Équation 4 devient :

Équation 5
$$dC_L / dt = -Q_{O_2}X$$

Les résultats sont portés sur un graphique de la concentration de l'oxygène dissous dans le liquide (C_L) en fonction du temps. La valeur de la pente, lorsque la valve est fermée, correspond à la valeur négative de $Q_{O_2}X$ (Équation 5). Pour calculer k_La , un second graphique portant la concentration de l'oxygène dissous dans le liquide (C_L) en fonction de $(Q_{O_2}X + dC_L/dt)$ est tracé avec les valeurs retenues suite à la réouverture de la valve d'aération. La valeur de la pente correspond alors à la valeur négative inverse de k_La selon l'Équation 4.

4.3.6.3 Suivi de la rhéologie des boues durant la culture en fermenteur

La viscosité est mesurée avec un viscosimètre rotatoire *Viscometer 98-936* de Cole-Parmer Instruments Inc. (Canada)⁷⁵. La taille des particules des boues est mesurée avec un analyseur de particules au laser *Laser particle sizer analysette 22* de Fritsch (Idar-Oberstein, Allemagne)⁷⁶. Les analyses sont réalisées sur tous les échantillons récoltés durant la fermentation. Les mesures sont effectuées sur les échantillons récoltés à chaque 3h.

4.3.6.4 Activité protéolytique

La production de protéases alcalines par Btk HD-1 est évaluée en analysant l'activité protéolytique des milieux de culture fermentés. La réaction enzymatique impliquée dans cette mesure consiste en une hydrolyse de la caséine en tyrosine par les protéases de l'échantillon ou la solution standard enzymatique. L'analyse est basée sur la méthode de Kunitz (1947) avec quelques modifications proposées par Tyagi et al. (2002). Une solution standard enzymatique de 1,2 UI/l est préparée avec 1 mg de subtiloéptidase (Sigma, Canada) dans 10 ml de tampon phosphate Sorensen ajusté à pH 7,5. L'échantillon à analyser est dilué dans un tampon borate ajusté à pH 8,2. Une solution de 1,2% de caséine fraîche (Sigma, Canada) est préparée dans du tampon borate ajusté à pH 8,2. Cinq millilitres de la solution de caséine sont mélangés avec 1 ml de solution standard ou de l'échantillon dilué. Le mélange est ensuite placé à 37°C dans un bain-marie *360 Orbital Shaker Bath* de Precision Scientifics (É.-U.). Après 10 min, 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique (ATC) sont ajoutés au mélange pour bloquer la réaction enzymatique. Le mélange est maintenu à 37°C

⁷⁵ À titre d'information, l'élément rotatoire du viscosimètre avait un diamètre de 1,2 cm et sa distance du réservoir contenant le liquide à analyser était de 2,5 mm. Le vitesse de l'élément rotatoire était 30 tours par min.

⁷⁶ À titre d'information, la vitesse de l'agitateur et celle de la pompe de recirculation de l'analyseur étaient respectivement 250 et 500 tours par min.

pour un autre 30 min. Un témoin est effectué pour chaque standard ou échantillon en ajoutant 5 ml d'une solution de ATC avant les 5 ml de la solution de caséine. À la fin de la réaction, la caséine non hydrolysée est retirée par filtration sur un filtre Whatman 934AH de Varian (É.-U.). Les résultats sont exprimés en unités internationales par millilitre (UI/ml). Théoriquement, une unité d'enzyme qui hydrolyse la caséine pour générer une couleur correspond à 1 μM de tyrosine produite par minute. L'absorbance est convertie en μM de tyrosine par minute avec une courbe standard de la concentration de tyrosine en fonction de l'absorbance à 275 nm. La courbe standard est effectuée avec la L-tyrosine (Sigma, Canada) diluée dans 50% d'une solution de ATC et 50% de tampon borate ajusté à pH 8,2 pour une concentration finale de 1000 μM . Le calcul est effectué en tenant compte du volume total de la solution (11 ml) et du facteur de dilution de l'échantillon. Pour chaque échantillon, un blanc est réalisé. Il consiste à ajouter la solution ATC avant la solution enzymatique (ou l'échantillon). L'erreur de la méthode a été évaluée à 8%.

4.4 Optimisation des traitements des boues

Les expériences préliminaires sur les traitements permettent de sélectionner les meilleurs traitements afin de réduire le nombre à optimiser. Elles permettent aussi d'établir les **valeurs optimales provisoires**. L'optimisation doit couvrir des intervalles pertinents de valeurs pour chacune des variables, ce qui demande de réaliser un nombre considérable d'expérience en fioles Erlenmeyer. Le plan composite centré (PCC) est la méthode statistique proposée pour planifier les expériences d'optimisation et réduire leur nombre. Les expériences planifiées avec le PCC ont été conduites dans un ordre au hasard pour éviter les biais. La méthodologie de réponse en surface (MRS) est utilisée pour traiter les résultats du PCC et cerner, entre autres, les valeurs optimales pour chaque variable. Ces dernières sont vérifiées dans une série d'expériences en fioles Erlenmeyer et testées dans des expériences en fermenteur. Le logiciel STATISTICA de STATSOFT Inc. (Thulsa, É.-U.) est utilisé pour analyser les résultats du PCC par la méthodologie de réponse en surface (MRS). Le PCC et la MRS sont décrits en détails dans le chapitre 6.

4.5 Préparation des suspensions de spores et de cristaux de Bt

L'étude des cristaux protéiques insecticides (CPI) et des spores de Btk HD-1 requiert de séparer ces deux éléments du milieu de culture afin qu'aucun métabolite ou autre élément du milieu de culture n'interfère durant les analyses. Leur densité permet de les séparer efficacement par centrifugation.

Pour des analyses plus poussées sur les CPI et les spores, une étape de purification est requise. La méthode utilisée dans ce travail s'inspire des travaux de Thomas et Ellar (1983), de Scherrer et al. (1973) ainsi que de Sharpe et al. (1975). Plusieurs autres méthodes existent et elles sont énumérées dans le chapitre 7. La justification du choix de la méthode est aussi décrite dans le chapitre 7.

La méthode pour isoler et purifier les spores et les CPI est divisée en trois étapes principales. La première partie vise à séparer le milieu de culture, les éléments dissous et les débris cellulaires par centrifugation. Cela permet d'obtenir un culot contenant des spores et des CPI ainsi qu'un surnageant contenant les éléments solubles du bouillon fermenté (Thomas et Ellar, 1983). La deuxième partie consiste à obtenir une suspension pure de spores par centrifugation en dissolvant les CPI dans une solution alcaline (Scherrer et al., 1973). La troisième partie consiste à obtenir une suspension pure de CPI par ultracentrifugation en utilisant des gradients de sucrose. Cette partie inclut une étape de séparation des CPI des spores par un traitement ultrasonique afin d'éliminer les spores viables (Sharpe et al., 1975). Des bioessais sont finalement appliqués sur les culots, les surnageants ainsi que les suspensions de spores et les CPI purifiés. Un schéma de l'ensemble des procédures est disponible à l'Annexe 6.

4.5.1 Centrifugation du bouillon fermenté

Plusieurs séances de centrifugation sont nécessaires pour extraire les spores et les CPI du bouillon fermenté. L'échantillon de bouillon fermenté est obtenu en transférant aseptiquement 40 ml de celui-ci dans un tube à centrifuger stérile de 40 ml. L'échantillon est ensuite centrifugé à 7000 tours par min à 4°C pendant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse *Sorvall RC-S5 Plus superspeed centrifuge* de DuPont (É.-U.). Après la centrifugation, le surnageant est retiré de façon aseptique. Le surnageant est conservé dans une bouteille stérile à 4°C pour des analyses d'entomototoxicité sur les métabolites secondaires dissous de Btk HD-1⁷⁷. Le culot est resuspendu dans de l'eau saline saline (0.85% NaCl, p/v) très froide (et stérile) afin de minimiser l'activité protéolytique des protéases adsorbées sur les surfaces des spores ou des cristaux (Faloci et al., 1990). Le culot resuspendu est centrifugé à 7000 tours par min à 4°C pendant 10 min. Après la centrifugation, le surnageant est retiré de façon aseptique et le culot est resuspendu dans l'eau saline. Il est centrifugé pour une seconde fois. La procédure est répétée jusqu'à ce qu'aucun débris cellulaire ne soit observé au microscope à contraste d'interférence différentielle (X1600). Le culot final est suspendu

⁷⁷ Le contenu en protéines du surnageant a été mesuré. L'ensemble pour l'analyse des protéines solubles de Bio-Rad no.500-0001 (Ontario, Canada) a été utilisé pour cette mesure.

dans de l'eau distillée stérile saline pour un volume final de 20 ml dans une bouteille stérile de 50 ml. Le culot final est soit utilisé pour les étapes subséquentes d'isolation et de purification ou pour des tests d'entomotoxicité⁷⁸.

4.5.2 Purification des spores

Pour analyser le pouvoir entomotoxique des spores de Btk HD-1 en absence des CPI, il est nécessaire de retirer les CPI du bouillon fermenté centrifugé (culot). Dans un tube à centrifuger stérile de 40 ml, 10 ml du culot suspendu est mélangé de façon aseptique avec 10 ml d'une solution NaOH 0,16 N stérile. Avec le facteur de dilution, le traitement alcalin s'effectue dans une solution NaOH de 0,08 N. Cette concentration était suffisante pour dissoudre les CPI (le pH du traitement doit être de 12). Le tube est déposé dans un bain-marie à 37°C pendant 60 min. Ensuite, le culot est centrifugé à 7000 tours par min à 4°C pendant 10 min. Une fois centrifugé, le surnageant est retiré et la présence de CPI dans le culot est vérifiée au microscope à contraste d'interférence différentielle (X1600). La procédure est répétée si des cristaux sont toujours présents. Le culot final est suspendu dans 8 ml d'eau distillée stérile très froide et la quantité de spores est vérifiée par la technique d'étalement sur gélose. La quantité résiduelle de protéines est également vérifiée en mesurant le contenu en protéine dissoute du culot final avec l'ensemble Bio-Rad no.500-0001 (Bio-Rad, Canada) pour l'analyse des protéines. Le culot final est conservé à 4°C avant d'évaluer son entomotoxicité par des bio-essais.

4.5.3 Purification des CPI

Cette étape est adaptée pour l'ultracentrifugation effectuée avec un *Beckman rotor Type SW40 Ti*⁷⁹. Elle est divisée en deux parties : un traitement ultrasonique pour tuer les spores sans toucher à l'intégrité des CPI et une séance d'ultracentrifugation.

⁷⁸ Le contenu en protéines du culot a aussi été mesuré. Comme les protéines du culot sont insolubles, une étape de solubilisation est nécessaire. Un traitement alcalin, tel que décrit à la section 4.5.2, a été appliqué sur un aliquot du culot resuspendu pour dissoudre les protéines insolubles, soit les CPI. L'ensemble pour l'analyse des protéines solubles de Bio-Rad no.500-0001 a été utilisé pour cette mesure.

⁷⁹ Thomas et Ellar (1983) ont utilisé un rotor *Beckman SW25.1* à 80000 g pour l'ultracentrifugation. Pour ce type de rotor dont les limites maximales en tours par min et en g sont respectivement 25000 et 90000, 80000 g correspond à 22124 tours par min. Le *Beckman rotor Type SW40 Ti* permet d'atteindre cette vitesse de rotation.

4.5.3.1 Traitement ultrasonique

Dans un tube à centrifuger stérile de 40 ml contenant 0,5 g de billes microscopiques (0,5 μ m) stériles, 10 ml du culot final sont mélangés de façon aseptique à 30 ml d'eau distillée stérile et très froide. Pour éviter que les spores tuées forment des agrégats après la centrifugation du culot, 0,5 ml de Tween 80 est ajouté. En milieu aseptique, le tube est déposé dans un appareil à ultrasons *Brandsonic 1510* réglé à 120 kHz et 150 watts pendant 60 min. Ensuite, le contenu du tube est centrifugé à 7000 tours par min à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est retiré et le culot est suspendu dans 4 ml d'eau distillée stérile très froide. La présence de spores dans le culot est vérifiée au microscope. La procédure est répétée jusqu'à l'absence de spores au microscope. Un aliquot de culot suspendu est aussi étalé sur un Pétri de GTS pour vérifier la présence de spores résiduelles.

4.5.3.2 Ultracentrifugation avec gradients de sucrose

Trois solutions de sucrose de 45%, 67% et 87% (p/v) sont fabriqués et stérilisés. En milieu aseptique, 3 ml de chacune de ces solutions, du plus dense ou moins dense, sont déposés dans un tube à centrifuger *Ultra-Clear* (14x95 mm) pour rotor *SW40 Ti* de Beckman (É.-U.). Cinq ml du culot final ultrasonifié est déposé à la surface du gradient. Les tubes à centrifuger sont balancés et installés dans le rotor *SW40 Ti* de Beckman. L'ultracentrifugation est ensuite réalisée à 80 000 g et 4°C pendant 14h dans une ultracentrifugeuse *Optima XL ultracentrifuge* de Beckman. Les cristaux forment normalement une bande visible entre les gradients de sucrose 67% et 87% alors que les spores mortes ou vivantes (s'il en reste) peuvent être observées dans le culot au fond du tube. Le sucrose au-dessus de la bande de cristaux est retiré doucement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. La bande contenant des cristaux est alors absorbée avec une seringue à aiguille stérile et déposée dans un eppendorf gradué stérile de 2 ml. Pour un seul échantillon, plusieurs tubes doivent être ultracentrifugés afin de remplir complètement l'eppendorf. La présence de CPI (et de spores) est vérifiée au microscope. Finalement, l'eppendorf est centrifugé à 7000 tours par min pendant 5 min à 4°C afin de retirer le sucrose. Le culot final de cristaux est suspendu dans 4 ml d'eau très froide dans une bouteille stérile de 4 ml. Un calcul du pourcentage résiduel de contamination en spores (ou autre contamination) de la suspension finale de cristaux est réalisé par la technique d'étalement sur gélose. Le contenu en protéines de la suspension finale est également mesuré avec l'ensemble

de Bio-Rad⁸⁰. La suspension est conservée à 4°C avant d'effectuer les bio-essais. Des échantillons non dilués et dilués (1:9, 1:99) de surnageant, de CPI et de spores purifiées ont été utilisés pour les bioessais⁸¹.

⁸⁰ Pour analyser le contenu totale en protéines, 1 ml de la suspension finale de cristaux a été dissous avec 1 ml NaOH 0.16 N dans un tube Eppendorf de 2 ml. Le tube Eppendorf a été déposé dans un support à tube pour ensuite être placé dans un bain-marie à 37°C pendant 60 min. Ensuite, le tube est centrifugé à 7000 tours par min à 4°C pendant 10 min. Un millilitre du surnageant est alors récolté pour l'analyse. Le facteur de dilution avec le NaOH (1:1) a été pris en considération pour le calcul du contenu en protéines.

⁸¹ Les mortalités chez les larves de la TBE causées par ces échantillons ont été comparées avec celles d'un échantillon de Foray 76B dilué (1:9) dont l'entomotoxicité a été évaluée à environ (15000±1000) UI/µl.

CHAPITRE 5: ESSAIS PRÉLIMINAIRES SUR LES TRAITEMENTS DES BOUES

Ce chapitre présente les résultats des essais préliminaires sur l'effet des traitements sur la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité de Btk HD-1 ainsi que les caractéristiques des boues. Pour alléger le texte, les abréviations « BEM » et « BES » sont utilisées respectivement pour les boues d'épuration mixtes et secondaires.

5.1 Sélection des meilleurs traitements

Pour atteindre le premier objectif de ce travail, une étude approfondie sur plusieurs traitements des BEM et BES a été réalisée. La première étape de cette étude consistait à sélectionner les meilleurs traitements pour ensuite les optimiser. Les traitements ont été évalués selon le rendement de Btk HD-1 en termes de spores produites et d'entomotoxicité. **La sélection des meilleurs traitements se base sur les plus fortes augmentations d'entomotoxicité, c'est-à-dire lorsqu'ils accroissent l'entomotoxicité de plus de 50% par rapport au contrôle⁸².** En plus de déterminer les meilleurs traitements, cette étape de sélection a permis d'établir les valeurs optimales provisoires des paramètres expérimentaux de chaque traitement (section 4.4). Ces optima provisoires sont un élément essentiel pour la planification expérimentale et l'optimisation décrites dans le chapitre 6.

Chaque traitement a été appliqué sur les BEM et les BES. Certains paramètres expérimentaux ont été testés à deux ou trois différentes valeurs (ex. : température de l'hydrolyse thermique) alors que d'autres ont demeuré constants (ex. : température de l'hydrolyse alcaline). Le Tableau 7 indique les conditions expérimentales de chaque expérience. Seules les expériences contrôles ont été réalisées en dupliquata. En incluant les contrôles (en dupliquata) et considérant 2 types de boues à l'étude (BEM et BES), un total de 80 expériences préliminaires a été effectué en fioles Erlenmeyer. Des codes ont été attribués à chaque expérience (Tableau 7).

⁸² Les traitements sélectionnés augmentaient de plus de 50% l'entomotoxicité par rapport aux boues non pré-traitées. Le choix de ce pourcentage est arbitraire. La sélection devait se limiter à un certain nombre de traitement en raison du nombre trop élevé d'expériences qu'une sélection exhaustive occasionnerait.

Tableau 7 Conditions expérimentales et codes associés à chacune des expériences préliminaires sur les traitements. Les caractères gras représentent les paramètres pour lesquels différentes valeurs sont testées.

Traitement	Code	MES (g/l)	pH	Temp. (°Celsius)	Durée (h)	H ₂ O ₂ (ml/g MES)
Aucun (<i>Cont</i>)	<i>Cont25</i>	25				
	<i>Cont35</i>	35				
Hydrolyse acide (<i>Ac</i>)	<i>Ac25pH2</i>	25	2	30	24	
	<i>Ac25pH4</i>	25	4	30	24	
	<i>Ac35pH2</i>	35	2	30	24	
	<i>Ac35pH4</i>	35	4	30	24	
Hydrolyse alcaline (<i>Al</i>)	<i>Al25pH10</i>	25	10	30	24	
	<i>Al25pH12</i>	25	12	30	24	
	<i>Al35pH10</i>	35	10	30	24	
	<i>Al35pH12</i>	35	12	30	24	
Hydrolyse thermique (<i>Th</i>)	<i>Th25t140</i>	25	7	140	0,5	
	<i>Th25t160</i>	25	7	160	0,5	
	<i>Th25t180</i>	25	7	180	0,5	
	<i>Th35t140</i>	35	7	140	0,5	
	<i>Th35t160</i>	35	7	160	0,5	
	<i>Th35t180</i>	35	7	180	0,5	
Hydrolyse thermo-alcaline (<i>Tha</i>) ¹	<i>Tha25t140</i>	25	10	140	0,5	
	<i>Tha25t160</i>	25	10	160	0,5	
	<i>Tha25t180</i>	25	10	180	0,5	
	<i>Tha35t140</i>	35	10	140	0,5	
	<i>Tha35t160</i>	35	10	160	0,5	
	<i>Tha35t180</i>	35	10	180	0,5	
Traitement oxydant (<i>Oxy</i>)	<i>Oxy25c0.01</i>	25	3	70	2	0,01
	<i>Oxy25c0.03</i>	25	3	70	2	0,03
	<i>Oxy25c0.05</i>	25	3	70	2	0,05
	<i>Oxy35c0.01</i>	35	3	70	2	0,01
	<i>Oxy35c0.03</i>	35	3	70	2	0,03
	<i>Oxy35c0.05</i>	35	3	70	2	0,05
Traitement thermo-oxydant (<i>Tho</i>) ²	<i>Tho25c0.01</i>	25	10 (3)	140 (70)	0,5 (2)	0,01
	<i>Tho25c0.03</i>	25	10 (3)	140 (70)	0,5 (2)	0,03
	<i>Tho35c0.01</i>	35	10 (3)	140 (70)	0,5 (2)	0,01
	<i>Tho35c0.03</i>	35	10 (3)	140 (70)	0,5 (2)	0,03

¹ La valeur du pH a été déterminée selon les résultats obtenus avec *Al35pH10*.

² Les valeurs des paramètres de l'hydrolyse thermo-alcaline incluse dans ce traitement ont été déterminées selon les résultats de *Tha35t140*. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux paramètres du traitement oxydant suivant l'hydrolyse thermo-alcaline. Ces valeurs ont été déterminées avec *Oxy35c0.01*.

Les expériences énumérées au Tableau 7 ont été réalisées en plusieurs parties avec 4 échantillons de boues récoltés à des moments différents⁸³. Les prochaines sous-sections présentent les résultats obtenus pour chacun des essais avec les BEM, puis avec les BES.

⁸³ Les résultats de l'hydrolyse alcaline étaient nécessaires pour déterminer le pH de l'hydrolyse thermo-alcaline et c'est pour cette raison que les expériences préliminaires ont été réalisées en plusieurs séquences. De plus, une fois les résultats obtenus, le pH et la température de la meilleure hydrolyse thermo-alcaline étaient utilisés pour déterminer les paramètres de l'hydrolyse thermique du traitement thermo-oxydant. Des efforts ont été faits pour réaliser chaque séquence en moins de trois semaines avec la même boue. Les séquences des expériences et les échantillons de boues associées (BEM1, BEM2, BES1 et BES2) sont présentées à l'Annexe 7. Un contrôle négatif sans Btk HD-1 a été réalisé avec chacune des boues utilisées (boues stérilisées contenant 25 g MES/l).

5.1.1 Résultats avec les boues mixtes (BEM)

Les résultats des expériences préliminaires sur les traitements des BEM sont illustrés à la Figure 6. Les données expérimentales sont disponibles à l'Annexe 7. Les contrôles négatifs ont révélé que les boues mixtes utilisées dans cette série d'expérience (BEM1 et BEM2) n'ont aucun ou très peu d'effet entomotoxique envers les larves de *C. fumiferana*. Les prochaines sous-sections énumèrent les principales constatations tirées de la Figure 6.

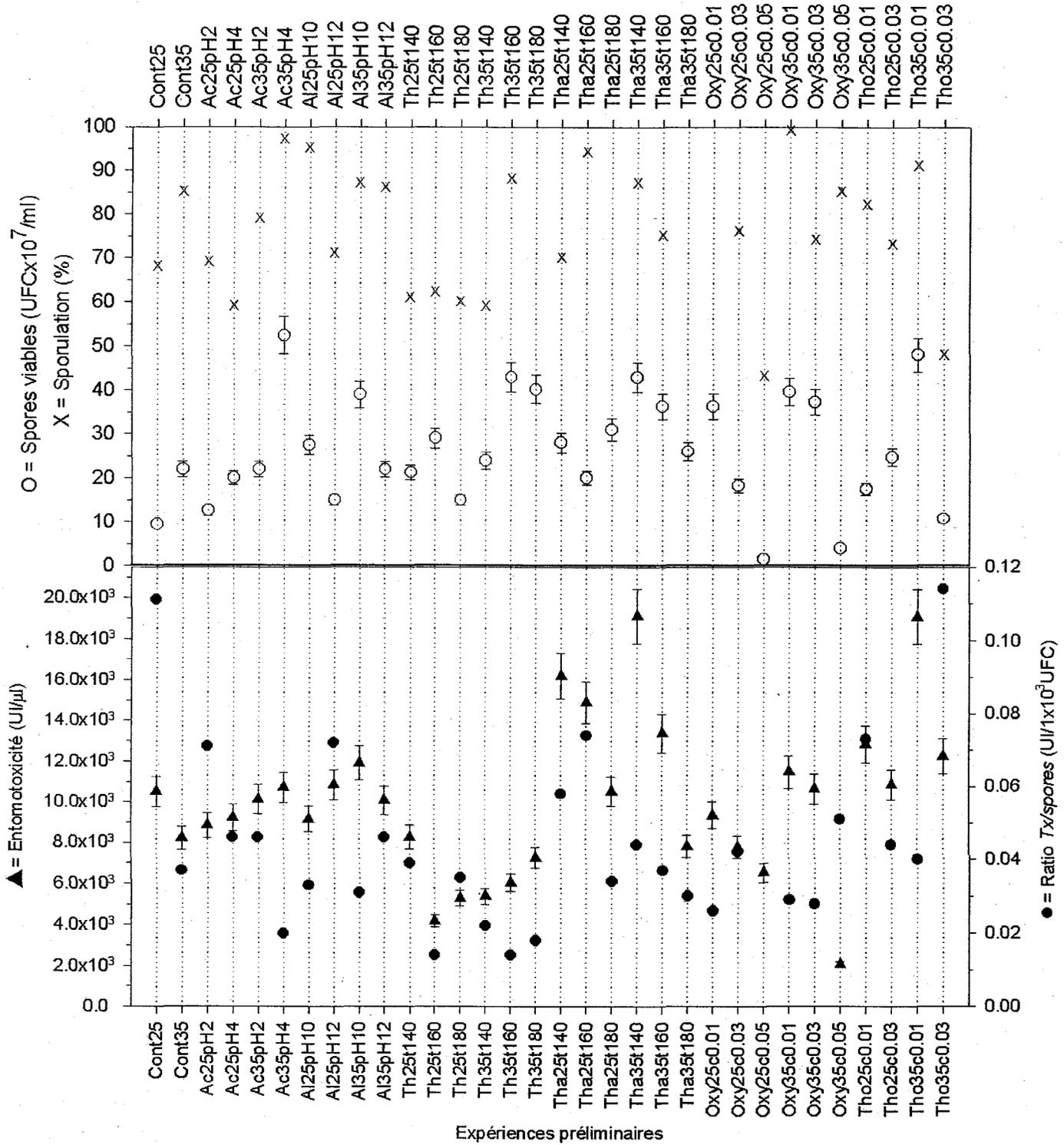


Figure 6 Concentration en spores viables, pourcentage de sporulation, entomotoxicité des suspensions de Btk HD-1 obtenues après 48 h de fermentation de boues mixtes d'épuration de la Ville de Québec, traitées ou non traitées. Essais préliminaires en fioles Erlenmeyer pour sélectionner les meilleurs traitements à optimiser.

5.1.1.1 Expériences contrôles avec les boues mixtes (*Cont25* et *Cont35*)

Btk HD-1 produit plus de spores dans les BEM contenant 35 g MES/l ($2,2 \times 10^8$ UFC/ml) que dans celles à 25 g MES/l ($9,5 \times 10^7$ UFC/ml). Toutefois, Btk HD-1 atteint une entomotoxicité plus élevée dans les MES à 25 g MES/l ($10,5 \times 10^3$ UI/ μ l à 25 g MES/l vis-à-vis $8,2 \times 10^3$ UI/ μ l à 35 g MES/l). Comme il est mentionné à la section 1.2.3.2, l'entomotoxicité diminue lorsque la concentration en MES augmente. Le même phénomène est observé dans ce cas-ci. Il y a plus de spores produites à 35 g MES/l et cette augmentation de spores n'implique pas nécessairement une meilleure entomotoxicité. L'entomotoxicité par spore (*Tx/spores*) est d'ailleurs plus faible à 35 g MES/l ($0,04$ UI/ 1×10^3 spores) vis-à-vis 25 g MES/l ($0,11$ UI/ 1×10^3 spores). Les spores produites à 35 g MES/l semblent moins toxiques.

5.1.1.2 Hydrolyse acide des boues mixtes (*Ac25pH2*, *Ac25pH4*...)

La fermentation des BEM ayant subies une hydrolyse acide donne des entomotoxicités légèrement différentes de celles des BEM non hydrolysées. À 25 g MES/l, des baisses légères de plus de 12% par rapport au contrôle *Cont25* sont observées. À 35 g MES/l, des augmentations de 23% (*Ac35pH2*) et de 30% (*Ac35pH4*) par rapport au contrôle *Cont35* ont été obtenues.

Quant à la production de spores, seule l'hydrolyse *Ac35pH4* augmente simultanément l'entomotoxicité (+30%) et les spores (+139%) par rapport au contrôle *Cont35*.

Aucun de ces essais n'a été sélectionné pour les travaux d'optimisation car ils n'augmentent pas l'entomotoxicité de plus de 50%.

5.1.1.3 Hydrolyse alcaline des boues mixtes (*Al25pH10*, *Al25pH12*...)

L'hydrolyse à pH 10 des BEM contenant 35 g MES/l (*Al35pH10*) se démarque en augmentant l'entomotoxicité de 45% ($11,9 \times 10^3$ UI/ μ l) et les spores produites de 77% ($3,9 \times 10^8$ UFC/ml) par rapport au contrôle *Cont35*. Les autres essais ont très peu d'influence sur l'entomotoxicité (*Al25pH10*, *Al25pH12*, *Al35pH12*). Cependant, les hydrolyses *Al25pH10* et *Al25pH12* augmentent le nombre de spores de 189% et 58% respectivement. Lorsque l'hydrolyse *Al35pH12* est appliquée, aucun changement n'est observé sur le nombre de spores produites.

Comme ces essais n'augmentent l'entomotoxicité de plus de 50%, aucun n'est sélectionné pour les expériences d'optimisation.

5.1.1.4 Hydrolyse thermique des boues mixtes (*Th25t140*, *Th25t160*...)

Dans tous les cas étudiés, l'hydrolyse thermique des BEM diminue l'entomotoxicité de 12% à 60% par rapport aux contrôles *Cont25* et *Cont35*. Toutefois, cette hydrolyse augmente le nombre de spores produites par Btk HD-1. À 25 g MES/l, les hydrolyses à 140°C, 160°C et 180°C augmentent le nombre de spores de 124%, 205% et 58 % respectivement par rapport au contrôle *Cont25*. À 35 g MES/l, les hydrolyses à 160°C et 180°C augmentent le nombre de spores de 95% et 83% respectivement par rapport au contrôle *Cont35*, mais celle à 140°C influence très peu leur production (+9%).

Malgré l'effet positif sur le nombre de spores produites dans plusieurs cas, cette hydrolyse n'augmente pas l'entomotoxicité et c'est pourquoi elle n'a pas été retenue pour les travaux d'optimisation.

5.1.1.5 Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes (*Tha25t140*, *Tha25t160*...)

Cette hydrolyse n'augmente pas l'entomotoxicité à température très élevée (180°C). Cependant, elle est très performante à 140°C et 160°C. En effet, elle augmente l'entomotoxicité de 54% à 140°C et 42% à 160°C avec 25 g MES/l, et de 132% à 140°C et 62% à 160°C avec 35 g MES/l. Ces augmentations sont très intéressantes d'autant plus qu'elles concordent avec des quantités élevées de spores produites (+65% à +195% par rapport aux deux contrôles).

Afin d'éviter un nombre trop élevé d'expériences d'optimisation, un seul de ces essais a été sélectionné : il s'agit de l'hydrolyse à 140°C des BEM contenant 35 g MES/l (*Tha35t140*) à laquelle une très forte entomotoxicité ($19,1 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$) et une production élevée de spores ($4,3 \text{ UFC} \times 10^8 / \text{ml}$) sont attribuées.

5.1.1.6 Traitement oxydant des boues mixtes (*Oxy25c0.01*, *Oxy25c0.03*...)

L'utilisation d'une quantité élevée de H_2O_2 (0,05 ml/g de MES) pour oxyder les BEM contenant 25 ou 35 g MES/l affecte de façon considérable l'entomotoxicité (-38% et -75%) et le nombre de spores produites (-86% et -82%).

Les essais utilisant 0,01 et 0,03 ml de H_2O_2 / g de MES augmentent le nombre de spores dans les boues contenant 25 et 35 g MES/l. Des augmentations de 70% à 282% par rapport aux deux contrôles ont été obtenues. Toutefois, seules des augmentations en entomotoxicité sont observées à 35 g MES/l : en utilisant 0,01 et 0,03 ml de H_2O_2 / g de MES, l'entomotoxicité augmente

respectivement de 39% et 29% par rapport au contrôle *Cont35*. Toutefois, l'augmentation de l'entomotoxicité n'est pas suffisante pour sélectionner l'un de ces deux essais.

5.1.1.7 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes (*Tho25c0.01*, *Tho25c0.03*...)

L'hydrolyse thermo-alkaline des BEM contenant 35 g MES/l, suivie d'un traitement oxydant avec 0,01 ml de H₂O₂ / g de MES (*Tho35c0.01*), donne d'excellents résultats en terme d'entomotoxicité (19,0x10³UI/μl, soit une augmentation de 131%) et de spores produites (4,8 UFCx10⁸/ml, soit une augmentation de 118%).

En raison de la forte entomotoxicité et de la grande quantité de spores produites par Btk HD-1, l'essai *Tho35c0.01* a été retenu pour les travaux d'optimisation.

5.1.2 Résultats avec les boues secondaires

Les résultats des expériences préliminaires sur les traitements des BES sont illustrés dans la Figure 7. Les données expérimentales sont disponibles à l'Annexe 7. Comme pour les boues mixtes, Les contrôles négatifs ont révélé que les boues secondaires utilisées dans cette série d'expérience (BES1 et BES1) n'ont aucun effet entomotoxique envers les larves de *C. fumiferana*. Les prochaines sous-sections énumèrent les principales constatations tirées de la Figure 7.

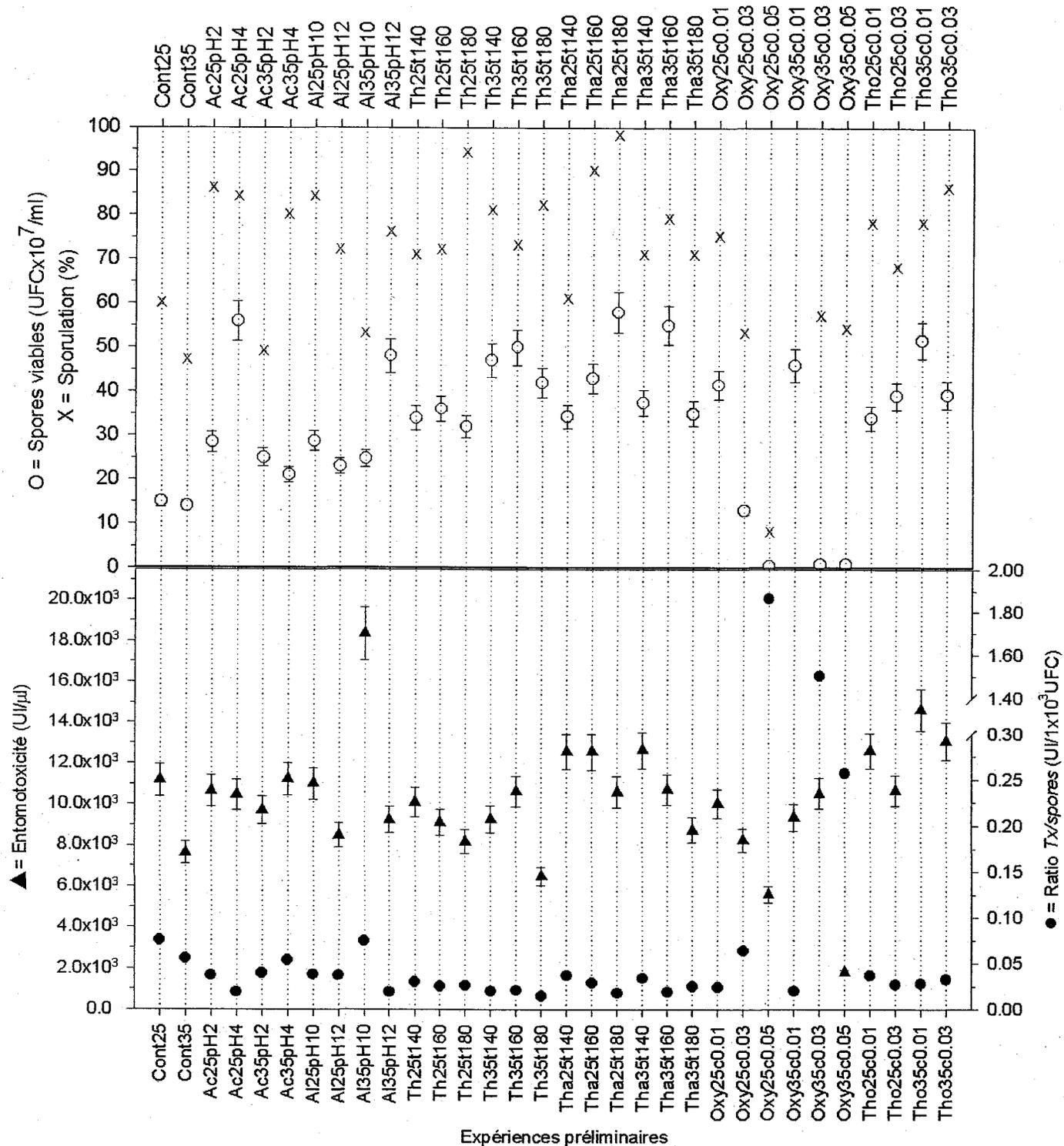


Figure 7 Concentration en spores viables, pourcentage de sporulation et entomotoxicités des suspensions de Btk HD-1 obtenues après 48 h de fermentation de boues secondaires d'épuration de la Ville de Québec, traitées ou non traitées. Essais préliminaires en fioles Erlenmeyer pour sélectionner les meilleurs traitements à optimiser.

5.1.2.1 Expériences contrôles sur les boues secondaires (*Cont25* et *Cont35*)

Pour une même concentration en MES de 35 g/l, Btk HD-1 montre une entomotoxicité légèrement plus faible dans les BES par rapport aux BEM ($7,7 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ pour les BES vis-à-vis $8,3 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ pour les BEM). Comme dans le cas des BEM, Btk HD-1 atteint une entomotoxicité supérieure dans les BES à 25 g MES/l ($11,2 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ à 25 g MES/l vis-à-vis $7,7 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ à 35 g MES/l).

L'effet de la concentration en MES sur la sporulation de Btk HD-1 paraît avoir un impact négatif dans les BES car moins de cellules sporulent (47% de sporulation dans les BES vis-à-vis 85% dans les BEM). Le nombre de spores produites dans les BES contenant 25 et 35 g MES/l est similaire, mais le ratio *Tx/spores* est légèrement différent (0,08 à 25 g/l et 0,06 à 35 g/l).

5.1.2.2 Hydrolyse acide des boues secondaires (*Ac25pH2*, *Ac25pH4*...)

Les hydrolyses à pH 2 et 4 des BES (à 25 et 35 g MES/l) augmentent le nombre de spores de 50% à 273% par rapport aux deux contrôles. Cependant, aucune hydrolyse n'augmente l'entomotoxicité de plus de 50%, les plus fortes augmentations étant de 27% et 47% pour *Ac35pH2* et *Ac35pH4* respectivement. Aucun de ces essais n'est retenu pour les expériences d'optimisation.

5.1.2.3 Hydrolyse alcaline des boues secondaires (*Al25pH10*, *Al25pH12*...)

L'hydrolyse à pH 10 des BES à 35 g MES/l (*Al35pH10*) conduit à une excellente entomotoxicité ($18,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$, une augmentation de 140% vis-à-vis le contrôle *Cont35*) et un nombre de spores élevé ($2,5 \times 10^8 \text{UFC}/\text{ml}$, soit une augmentation de 76%). À pH 12 pour la même concentration en MES, le nombre de spores augmente considérablement (+243%), mais l'entomotoxicité augmente seulement de 21%. À 25 g MES/l, le nombre de spores augmente de 53% à pH 10 et de 91% à pH 12 par rapport au contrôle *Cont25*, mais l'entomotoxicité varie peu (-2% à pH 10 et -24% à pH 12). L'expérience *Al35pH10* a donc été sélectionnée pour l'optimisation.

5.1.2.4 Hydrolyse thermique des boues secondaires (*Th25t140*, *Th25t160*...)

Dans tous les cas, l'hydrolyse thermique des BES augmente le nombre de spores produites par Btk HD-1 de 113% et plus par rapport aux deux contrôles. Pour ce qui est de l'entomotoxicité, elle diminue de 10% à 27%, à l'exception de deux essais à 35 g MES/l où elle augmente de 21% à 140°C et de 39% à 160°C. Ces augmentations ne sont pas suffisantes et aucun de ces essais n'est sélectionné pour l'optimisation.

5.1.2.5 Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires (*Tha25t140, Tha25t160...*)

Comme pour les hydrolyses thermiques à pH neutre, les hydrolyses thermo-alcalines augmentent le nombre de spores produites par Btk HD-1 de plus de 129%. La plus forte augmentation en entomotoxicité est observée à 140°C et 35 g MES/l (*Tha35t140*) où $12,6 \times 10^3$ UI/ μ l sont obtenues (soit une augmentation de 65% par rapport au contrôle *Cont35*). Cet essai a été sélectionné pour les expériences d'optimisation. Les autres essais à 35 g MES/l, soit *Tha35t160* et *Tha35t180*, ont augmenté l'entomotoxicité de 40% et 14% respectivement. Les essais à 25 g MES/l (*Tha25t140, Tha25t160, Tha25t180*) ont quant eux peu d'effet sur l'entomotoxicité (moins de 12%).

5.1.2.6 Traitement oxydant des boues secondaires (*Oxy25c0.01, Oxy25c0.03...*)

Comme pour les BEM, l'utilisation d'une quantité élevée de H₂O₂ (0,05 ml/g de MES) pour pré-traiter les BES contenant 25 et 35 g MES/l diminue considérablement l'entomotoxicité (de -50% et -76% respectivement) et le nombre de spores produites (de -98% et -95% respectivement). En oxydant partiellement les BES contenant 35 g MES/l avec 0,03 ml de H₂O₂, une diminution importante de 95% du nombre de spores est observée. Toutefois, l'entomotoxicité augmente de 38%, ce qui entraîne une hausse très importante du ratio *Tx/spores* ($1,5 \text{ UI}/1 \times 10^3$ spores). Pour 0,01 ml de H₂O₂, la production de spores augmente considérablement de 177% à 25 g MES/l et de 229% à 35 g MES/l, mais l'entomotoxicité est peu influencée (-9% à 25 g MES/l et +19% à 35 g MES/l). Aucun de ces traitements n'est sélectionné en raison de leur influence négative ou faiblement positive sur l'entomotoxicité de Btk HD-1.

5.1.2.7 Traitement thermo-oxydant des boues secondaires (*Tho25c0.01, Tho25c0.03...*)

L'utilisation de 0,01 et 0,03 ml/g MES de H₂O₂ pour oxyder partiellement des BES à 35 g MES/l permet d'obtenir de fortes entomotoxicités ($14,6 \times 10^3$ UI/ μ l, soit une augmentation de 91% pour 0,01 ml de H₂O₂, et $13,1 \times 10^3$ UI/ μ l, soit une augmentation de 71% pour 0,03 ml). De plus, des concentrations très élevées en spores sont obtenues à 25 et 35 g MES/l (de $3,4 \times 10^8$ à $5,1 \times 10^8$ spores/ml, soit des augmentations de 125 à 269% par rapport aux deux contrôles). Cependant, les essais à 25 g MES/l influencent peu l'entomotoxicité (+13% avec 0,01 ml de H₂O₂ et -5% avec 0,03 ml). L'expérience *Tho35c0.01* a été sélectionnée pour les travaux sur l'optimisation.

5.2 Effets des traitements sur le potentiel nutritif des boues

Les expériences préliminaires ont permis d'une part de sélectionner les meilleurs traitements et d'autre part, de constater que le type d'hydrolyse influence le rendement de Btk HD-1. Cette observation peut s'expliquer avec les nouvelles caractéristiques des boues après leur hydrolyse. La revue de littérature au chapitre 2 traite des effets des traitements sur la composition des boues. Pour consolider cette information et faciliter l'interprétation des résultats des essais préliminaires, des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur les boues à l'étude avant et après traitement. Les concentrations en MES, MVES, éléments traces dissous, COD et protéines solubles ainsi que la biodégradabilité et la viscosité ont été analysées.

Les expériences préliminaires suivantes ont été étudiées : *Al35pH10*, *Tha35t140* et *Tho35c0.01*. Ces traitements avaient donné d'excellents rendements avec les BEM et les BES. Pour des fins de comparaison, le contrôle *Cont35* a été étudié. Les expériences préliminaires *Ac35pH2*, *Th35t140* et *Oxy35c0.01* ont aussi été étudiées afin d'avoir un aperçu de l'effet de ces traitements sur les boues. Le Tableau 8 présente les traitements étudiés et les codes qui leur sont associés.

Tableau 8 Expériences réalisées sur la composition des boues après divers traitements. Avant les analyses, les boues traitées ou non traitées ont été ajustées à pH neutre et stérilisées. Les traitements ont été appliqués sur les boues d'épuration mixtes (BEM) et secondaires (BES). Les expériences ont été réalisées en duplicata.

Code	Principaux paramètres des traitements
<i>Cont35</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, aucun traitement, stérilisation
<i>Ac35pH2</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, hydrolyse acide à pH 2, stérilisation
<i>Al35pH10</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, hydrolyse alcaline à pH 10, stérilisation
<i>Th35t140</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, hydrolyse thermique à 140°C et pH 7, stérilisation
<i>Tha35t140</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, hydrolyse thermo-alcaline à 140°C et pH 10, stérilisation
<i>Oxy35c0.01</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, oxydation avec 0,01 ml H ₂ O ₂ / g MES, stérilisation
<i>Tho35c0.01</i>	Boue ajustée à 35 g MES/l, hydrolyse thermo-alcaline (140°C, pH 10) suivie d'une réaction d'oxydation avec 0,01 ml H ₂ O ₂ / g MES, stérilisation

* Les boues utilisées sont BEM 3 et BES 3, voir l'Annexe 6 pour leur composition.

Les effets des traitements sur diverses caractéristiques des boues sont présentés dans les prochaines sous-sections. Pour chaque traitement, une comparaison est faite avec le contrôle. Les écarts relatifs avec les valeurs du contrôle sont présentés sous forme de pourcentage. Les données des analyses et les calculs des écarts relatifs sont disponibles à l'Annexe 7. Une récapitulation de tous les effets des traitements est aussi disponible à l'Annexe 7.

5.2.1 Influence sur le contenu en C_t et COD, et le ratio C/N

Les effets des traitements sur le contenu en COD et en C_t des boues sont illustrés à la Figure 8.

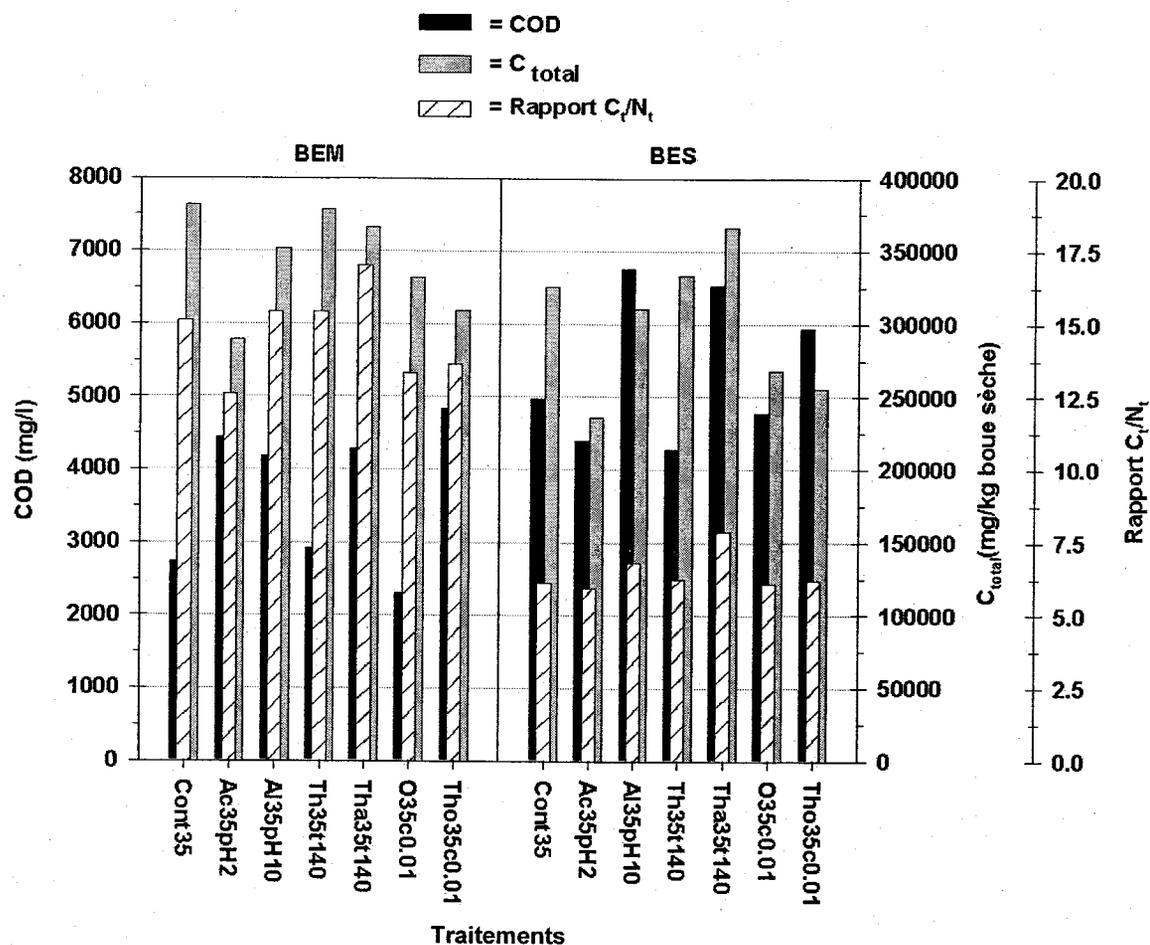


Figure 8 Effets des traitements sur le contenu en carbone total (C_{total}) et en carbone organique dissous (COD), et sur le ratio C_i/N_i des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).

Le contenu en COD représente les sources de carbone dissoutes facilement assimilables par les microorganismes. Il peut s'agir par exemple de monosaccharides, de polysaccharides, de protéines complexes et d'AGV. Les réactions d'hydrolyse peuvent briser les débris cellulaires et libérer des sources de carbone organique. Selon la Figure 8, les traitements augmentent dans plusieurs cas le COD des BEM. L'hydrolyse acide (*Ac35pH2*), l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*), l'hydrolyse thermo-alcaline (*Tha35t140*) et le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) des augmentent respectivement le contenu en COD des BEM de 62%, 53%, 57% et 77%.

Pour les BES, les traitements alcalin (*Al35pH10*), thermo-alcalin (*Tha35t140*) et thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) augmentent le COD de 19% à 36%. Pour leur part, le traitement oxydant (*O35c0.01*) n'influence pas le COD (-4%) alors que l'hydrolyse acide le diminue légèrement (-12%).

En ce qui concerne l'hydrolyse thermique à pH neutre (*Th35t140*), elle influence très peu le contenu en COD des BEM (+7%) et BES (-14%).

Le contenu en C_t des boues peut varier suite à un traitement si le carbone se volatilise sous forme de CO_2 ou d'acides gras volatils (AGV). La diminution du C_t des boues traitées par rapport au contrôle indique qu'une partie de celui-ci s'est volatilisée. Selon la Figure 8, des diminutions du C_t des BEM et BES de 13 à 28% ont été causées par l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*), le traitement oxydant (*O35c0.01*) et le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*). Une faible augmentation du C_t de 12% a cependant été observée avec l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) des BES. Cette augmentation peut être attribuée à une erreur expérimentale puisque le C_t ne peut augmenter dans le milieu à moins d'un apport exogène dans les boues, ce qui n'est pas le cas avec la méthode utilisée.

La volatilisation du C_t peut avoir des répercussions sur la croissance microbienne et la production de produits microbiens. Une perte en C_t peut entraîner un changement du ratio C : N qui est un paramètre important pour la production de Bt et ses métabolites (Vidyardhi et al., 2002). Les résultats de l'effet des traitements sur le ratio C : N sont présentés à la Figure 8.

Selon la Figure 8, quelques traitements modifient le ratio C : N des BEM. L'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) et les traitements oxydant (*O35c0.01*) et thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) diminuent le ratio de 2 unités (valeurs approximatives de 13,0) par rapport au ratio du contrôle (valeur de 15,1) alors que l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) l'augmente (valeur de 17,0). Une baisse considérable du C_t après hydrolyse acide (*Ac35pH2*) a été observée à la Figure 8 et explique cette diminution du ratio. Quant à l'hydrolyse thermo-alkaline, elle ne modifie pas le C_t . Cependant, elle modifie le N_t et c'est pour cette raison que le ratio C : N varie (voir Figure 11).

Pour les BES, l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) est le seul traitement à avoir modifié le ratio en l'augmentant à 7,9 par rapport au ratio du contrôle qui est de 6,1. Comme pour les BEM, cette hydrolyse modifie le N_t , mais pas le C_t .

5.2.2 Influence sur la biodégradabilité

Les effets des traitements sur la biodégradabilité (en terme de MVES dégradées après 5 jours) sont illustrés à la Figure 9.

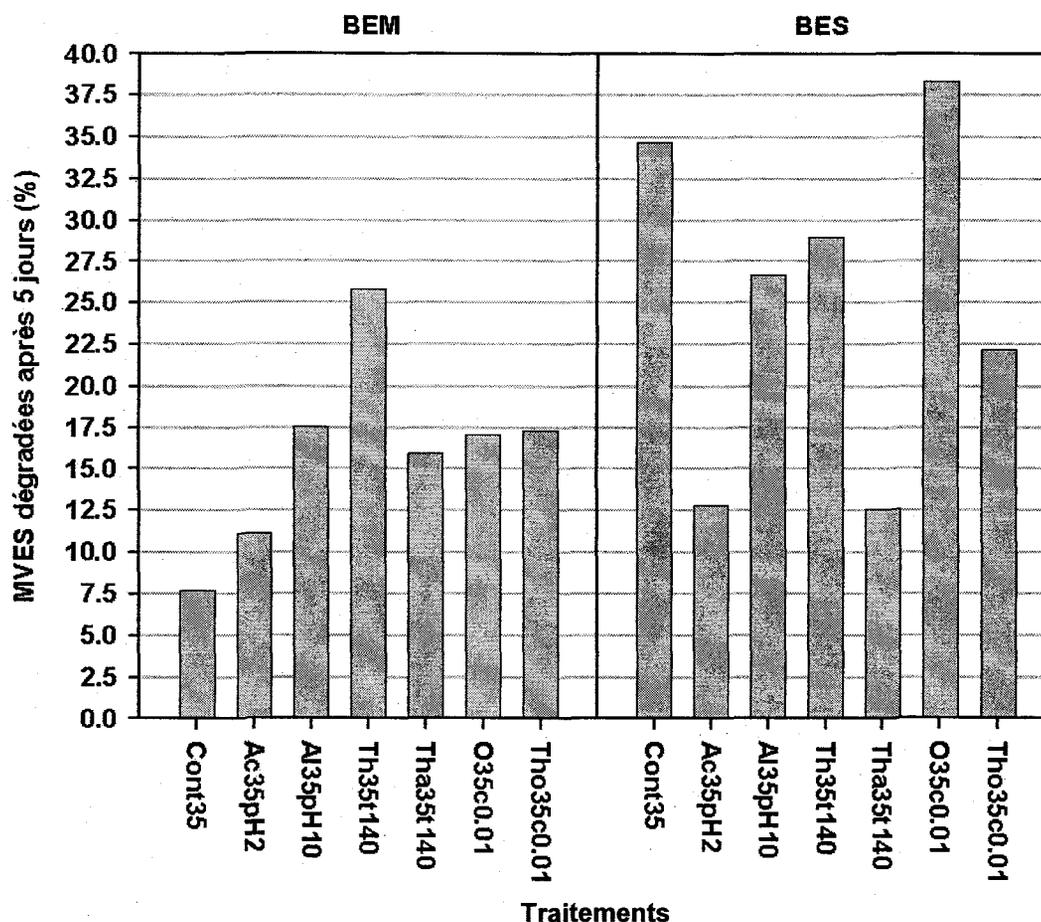


Figure 9 Effets des traitements sur la biodégradabilité (quantité de matières volatiles en suspension ou MVES dégradées après 5 jours exprimée en pourcentage) des boues épaissies (BEM) et secondaires (BES).

Le pourcentage de MVES dégradées après quelques jours est un indice de la biodégradabilité des boues (Benmoussa et al., 1998). Effectivement, plusieurs des MVES (amas de débris cellulaires ou de molécules organiques) sont biodégradables. Cependant, il est important de prendre note que le pourcentage de MVES dégradées après quelques jours ne correspond pas entièrement à la biodégradabilité. La méthode consiste à ajouter un inoculum microbien (boues fraîches) dans des boues hydrolysées et stériles. Dans cette circonstance, une diminution des MVES après quelques jours signifie qu'elles ont été solubilisées et volatilisées par des réactions biochimiques (activité microbienne) ainsi que des réactions chimiques. Il n'est pas possible avec cette mesure de faire la distinction entre la quantité de MVES dégradées par voie microbienne et celle par voie chimique.

Selon la Figure 9, une plus grande quantité de MVES des BEM traitées est dégradée et volatilisée. Les MVES des BEM ayant subies une hydrolyse thermique (*Th35t140*) sont plus sensibles aux

réactions de solubilisation et de volatilisation alors que l'effet de l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) est le moins important.

L'opposé est observé avec les BES. Les traitements affectent la susceptibilité des MVES aux réactions de dégradation et de volatilisation, à l'exception du traitement oxydant (*O35c0.01*) qui l'influence très peu.

5.2.3 Influence sur la viscosité

Les effets des traitements sur la viscosité des boues sont présentés à la Figure 10.

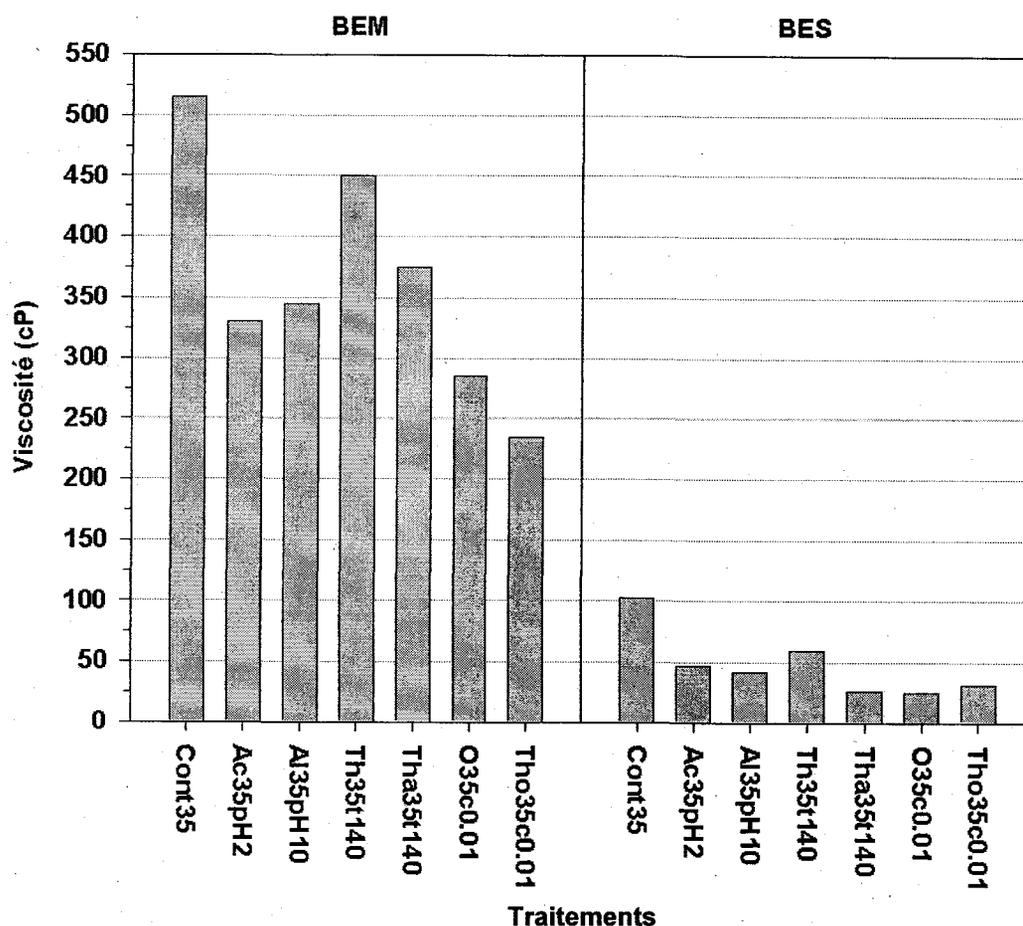


Figure 10 Effets des traitements sur la viscosité (exprimée en centipoise) des boues épaissies (BEM) et secondaires (BES).

Tous les traitements diminuent la viscosité des BEM de 13% à 54% et des BES de 41% à 76%.

Pour les BEM, une plus grande diminution est observée suite à des traitements oxydant (*O35c0.01*) ou thermo-oxydant (*Tho35c0.01*). La plus faible variation (-13%) est observée avec

l'hydrolyse thermique (*Th35t140*). Il en est de même pour les BES. Cependant, le traitement oxydant (*O35c0.01*) et l'hydrolyse thermo-alcaline (*Tha35t140*) semble avoir aussi une influence plus importante sur la viscosité des BES (+75% et +76% respectivement).

5.2.4 Influence sur le contenu en azote et protéines

Les effets des traitements sur le contenu en azote des boues sont illustrés à la Figure 11.

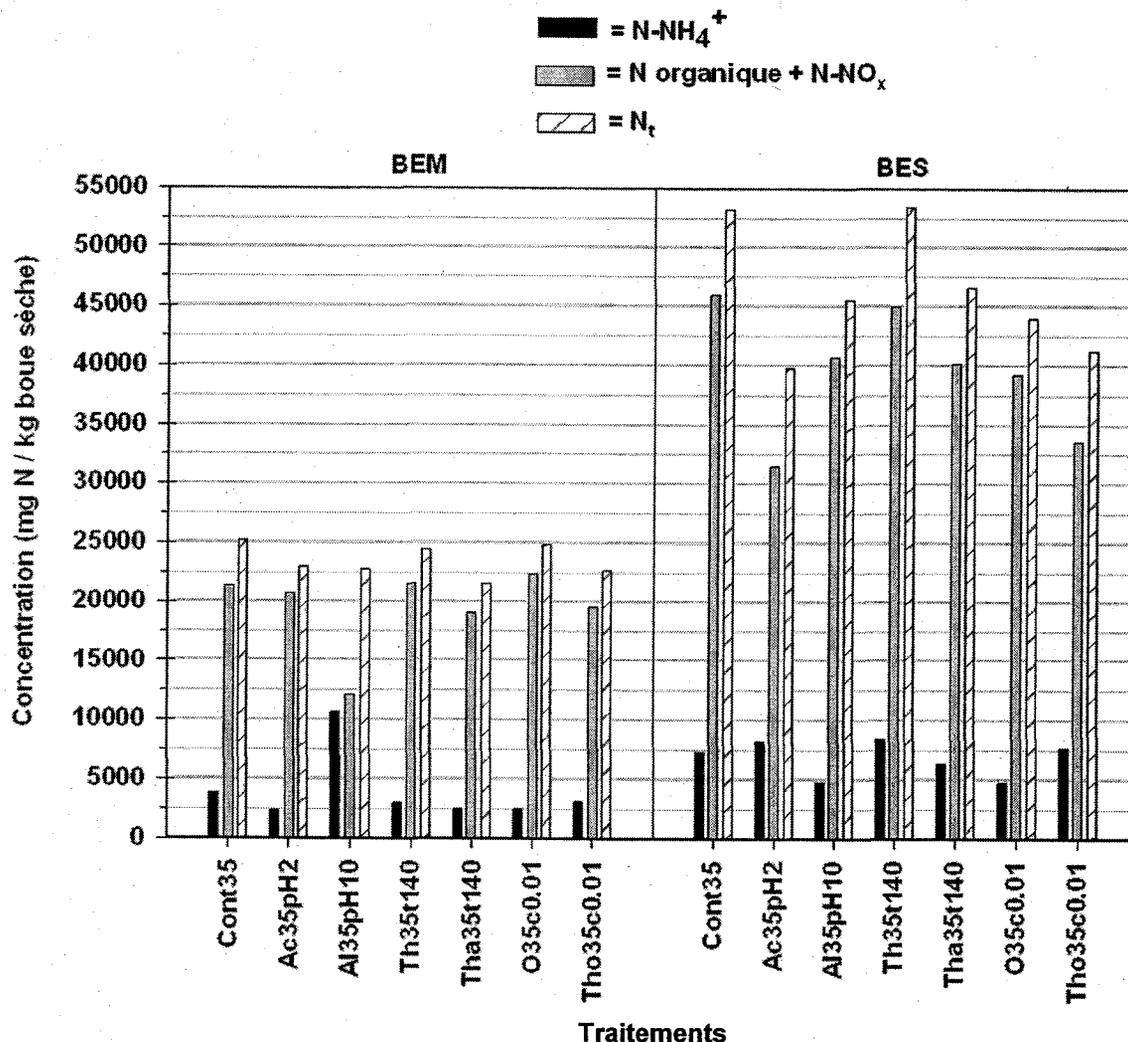


Figure 11 Effets des traitements sur la concentration en azote d'ammonium ($N-NH_4^+$), en azote organique et nitrique (N organique + $N-NO_x$) et en azote total (N_{total}) des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).

Tous les traitements diminuent le $N-NH_4^+$ dans les BEM (-19% à -40%), à l'exception de l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) qui l'augmente de 178%. Quant aux BES, l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) et le traitement oxydant (*O35c0.01*) diminuent le $N-NH_4^+$ (-35% approximativement)

alors que l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) l'augmente considérablement de 333%. Les autres traitements ont peu d'influence (-13% à +16%). Ces diminutions corroborent les baisses de N_t , particulièrement pour les BES, ce qui indique une volatilisation de l'azote sous forme d'azote ammoniacal ($N-NH_3$). Comme pour le C_t , la volatilisation du N_t peut entraîner un changement du ratio C : N (voir section 5.2.1).

Les traitements ont peu d'effet sur le contenu en ($N_{\text{organique}}+N-NO_x$) des BEM, à l'exception de l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) qui le diminue (-43%). Pour les BES, les traitements diminuent le contenu en $N_{\text{organique}}+N-NO_x$ (-11% à -82%), à l'exception de l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) qui ne l'influence pas (-2%).

La diminution en $N_{\text{organique}}$ ne corrobore pas nécessairement avec l'augmentation de l'azote inorganique ($N-NH_4^+$). On observe plutôt que une diminution de l'azote d'ammonium. Il y a donc eu beaucoup de pertes en azote, comme l'indique les valeurs de N_t .

En ce qui concerne les teneurs en protéines solubles, les effets des traitements sont présentés à la Figure 12.

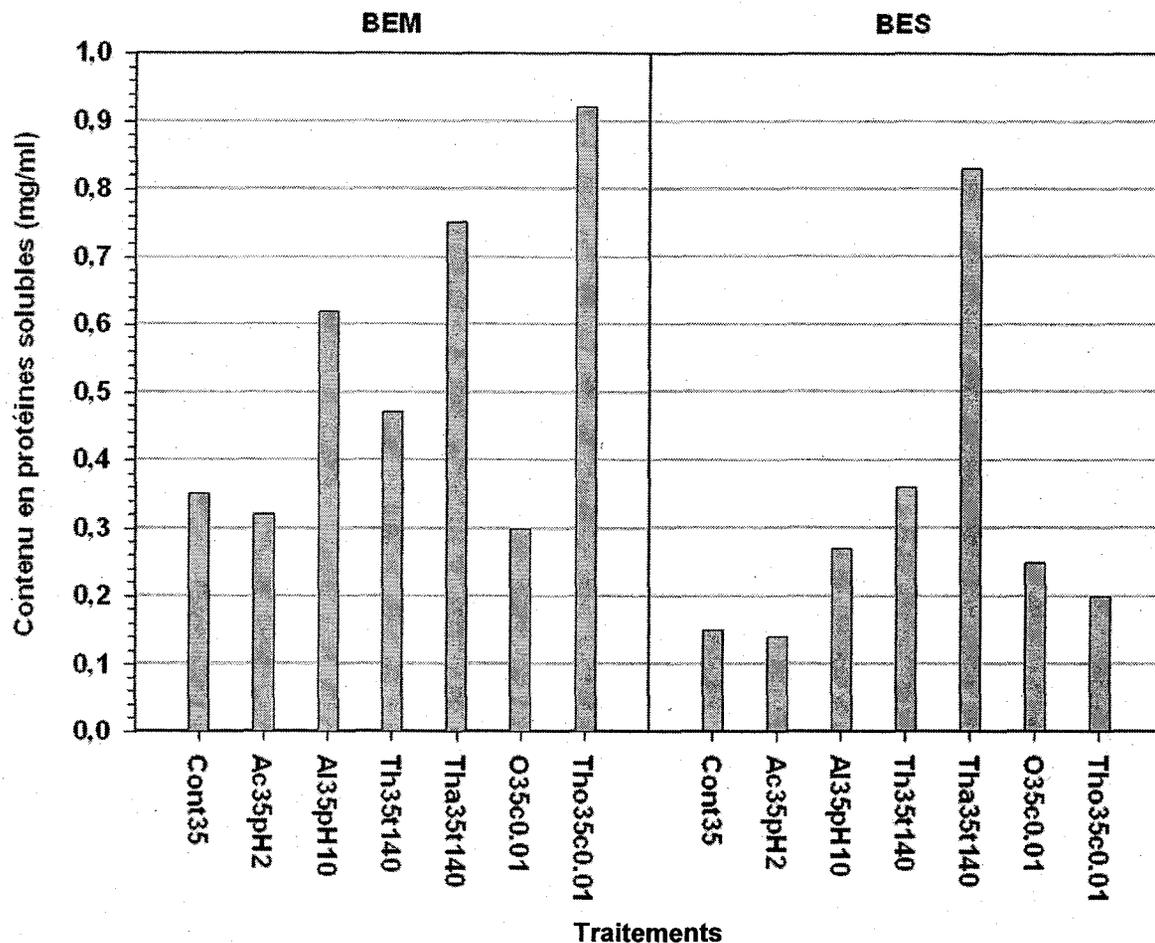


Figure 12 Effets des traitements sur le contenu en protéines solubles des boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).

Les hydrolyses alcaline (*Al35pH10*), thermique (*Th35t140*) et thermo-alcaline (*Tha35t140*) augmentent la concentration en protéines solubles des BEM de 89%, 99%, et 129% respectivement. L'hydrolyse thermique (*Th35t140*) augmente de 30% la quantité de protéines dissoutes alors que l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) et le traitement oxydant (*O35c0.01*) la diminuent de 15% et 18% respectivement.

Appliquées sur les BES, les hydrolyses alcaline (*Al35pH10*), thermique (*Th35t140*) et thermo-alcaline (*Tha35t140*) augmentent la concentration en protéines solubles de 88%, 141% et 414% respectivement. Les traitements oxydant (*O35c0.01*) et thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) augmentent quant à eux le contenu en protéines solubles de plus de 50%.

5.2.5 Influence sur la concentration en métaux dissous et autres éléments inorganiques dissous

Les effets des traitements sur la solubilisation des métaux et autres éléments inorganiques sont présentés dans les figures 13 et 14.

Selon la Figure 13, tous les traitements augmentent la quantité en phase soluble du Mo et du Zn des BEM (de 20% à 336% pour le Mo et de 81 à 990% pour le Zn). Les hydrolyses acide (*Ac35pH2*) et thermique (*Th35t140*) ainsi que le traitement thermo-oxydant, (*Tho35c0.01*) augmentent la concentration en Mn dissous de 333%, 47% et 176% respectivement alors que les autres traitements diminuent sa teneur de 25% à 60% par rapport au contrôle. Les traitements alcalin (*Al35pH10*), thermo-alcalin (*Tha35t140*) et thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) augmentent la concentration en Al dissous de 73% à 503% et en Fe dissous de 110% à 581%. La Figure 13 indique aussi que les BEM non traitées contiennent très peu de Cu en phase soluble (0,01 mg/l). Ce dernier augmente de 0,9 à 9,4 fois par rapport au contrôle après l'application des traitements alcalin (*Al35pH10*), thermique (*Th35t140*), thermo-alcalin (*Tha35t140*) et oxydant (*Tho35c0.01*).

En ce qui concerne les métaux traces en phase soluble dans les BES, des augmentations très importantes sont observées avec le Fe, le Cu, le Mn et le Zn suite à l'application de certains traitements. Selon la Figure 13, les BES non traitées contiennent peu de Cu dissous (0,02 mg/l). Ce dernier augmente considérablement dans les BES (de 8,5 à 16,6 fois par rapport au contrôle) après plusieurs traitements (*Al35pH10*, *Tha35t140*, *O35c0.01* et *Tho35c0.01*). Le Fe en phase soluble augmente de 24% à 163% et le Mn de 24% à 421% avec les traitements alcalin (*Al35pH10*), thermo-alcalin (*Tha35t140*), oxydant (*O35c0.01*) et thermo-oxydant (*Tho35c0.01*). Tous les traitements augmentent le Zn en phase soluble de 123% à 623% par rapport au contrôle, à l'exception de l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) qui l'influence très peu (-9%). L'effet le plus marquant est celui de l'hydrolyse thermo-alcaline (+623%). Il en est de même avec le Mo qui augmente de 13% à 103% dans la phase soluble. La teneur en Al dissous des BES diminue après l'application de la plupart des traitements (de -35% à -55%), à l'exception de l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) qui l'augmente (+478%) et de l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) qui l'influence très peu (-2%). Quant aux métaux traces Cd, Cr, Ni et Pb, les teneurs observées étaient très faibles dans les BEM et BES traitées et non traitées (<0,001 mg Cd/l, <0,15 mg Cr/l, <0,09 mg Ni/l et <0,02 mg Pd/l). Ils ne sont pas présentés dans la Figure 13, mais les valeurs sont disponibles à l'Annexe 7.

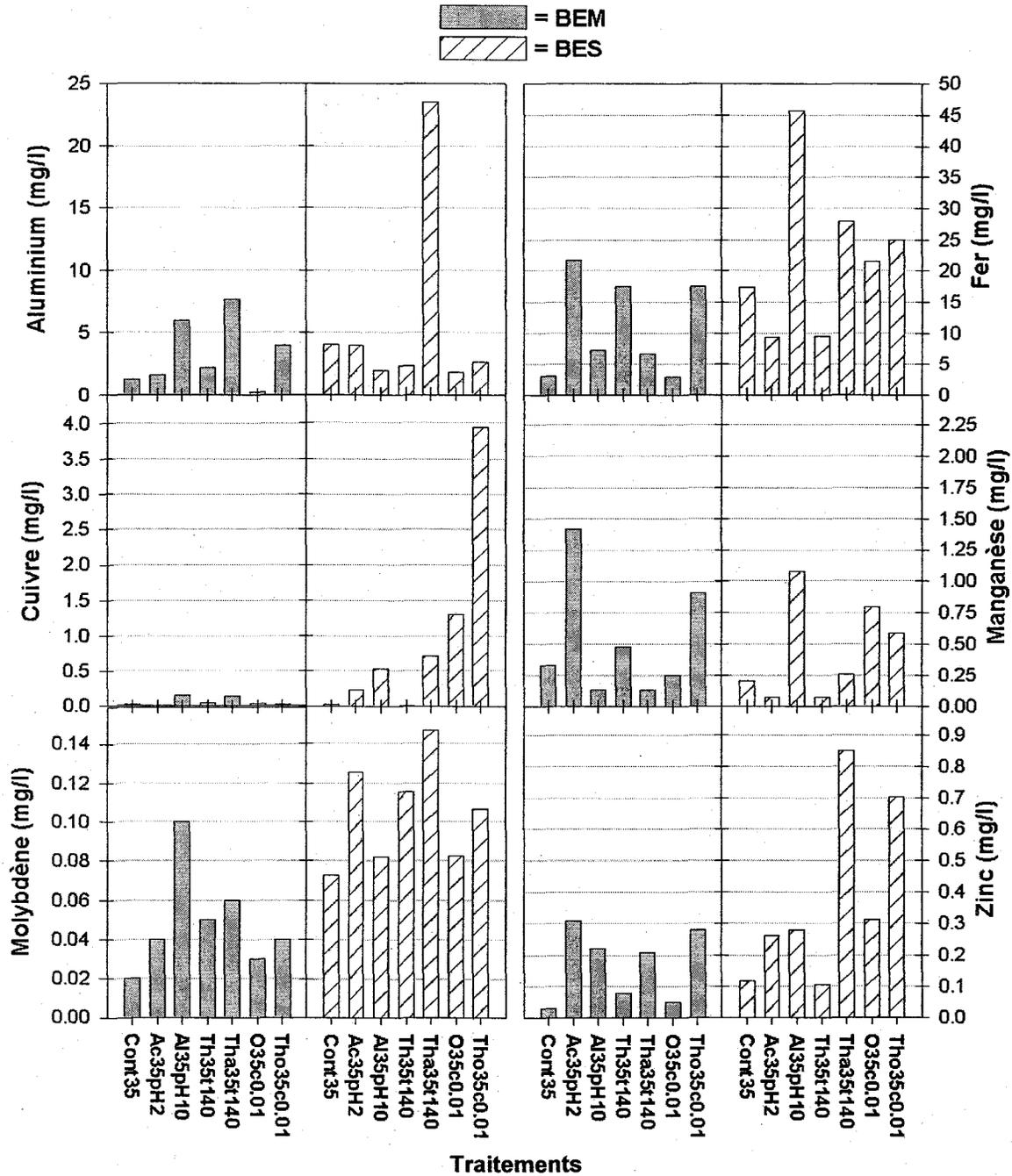


Figure 13 Effets des traitements sur la solubilisation de différents métaux traces présents dans les mixtes (BEM) et secondaires (BES).

Les traitements solubilisent également d'autres éléments inorganiques tels que Ca, P, Na, S, K et Mg. Selon la Figure 14, l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*), l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) et les traitements oxydants (*O35c0.01* et *Tho35c0.01*) solubilisent le Ca des BEM (de 33% à 255% par rapport au contrôle) alors que l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) et l'hydrolyse thermo-alcaline

(*Tha35t140*) provoque sa précipitation (-67% approximativement). L'hydrolyse acide (*Ac35pH2*), l'hydrolyse thermo-alcaline (*Tha35t140*) et l'hydrolyse thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) augmentent la teneur en P dissous des BEM de 85% à 157%. Toutefois, le traitement oxydant (*O35c0.01*) cause la précipitation du P (-81% par rapport au contrôle). Le Na dissous augmente considérablement suite à tous les traitements (4,4 à 10,2 fois plus que le contrôle), sauf pour l'hydrolyse thermique qui le diminue légèrement (-10%). Ces augmentations considérables de Na dissous s'expliquent en partie par l'ajout de NaOH pour réaliser les hydrolyses acides ou pour réajuster le pH suite à une hydrolyse acide. La teneur en S dissous augmente après tous les traitements de 60% à 315%, à l'exception de l'hydrolyse alcaline (*Tha35t140*) et l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) qui diminuent sa concentration de 58% et 93% respectivement. Comme pour la teneur en Na (mais de façon moins marquée), les augmentations s'expliquent en partie par l'ajout de H₂SO₄ pour ajuster le pH lors des traitements. Ce phénomène d'addition semble moins important avec l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) et l'hydrolyse thermique (*Th35t140*) pour lesquelles des baisses de S dissous ont été observées. La teneur en K dans la phase soluble des BEM est très peu influencée par les traitements (des augmentations de 8% à 16% sont observées), à l'exception du traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) qui l'augmente de 45% par rapport au contrôle

Selon la Figure 14, l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) et les traitements oxydants (*O35c0.01* et *Tho35c0.01*) des BES solubilisent une grande quantité de Ca (+230% à +482%). Les autres traitements diminuent la quantité de Ca dissous de 43 à 80%. Quant à la teneur en P dissous, elle augmente de 9% à 44% avec les hydrolyses alcaline (*Al35pH10*) et thermo-alcaline (*Tha35t140*) et le traitement oxydant (*O35c0.01*) alors qu'elle diminue de 17% et 20% avec l'hydrolyse acide (*Ac35pH2*) et le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) respectivement. La teneur en Na dissous des BES augmente considérablement suite à l'application de tous les traitements (de 126% à 681%) et ce, pour la même raison que les BEM. Cependant, contrairement aux BEM, le Na dissous des BES augmente après une hydrolyse thermique (+126%). La teneur en S dissous augmente avec les traitements alcalin, thermo-alcalin, oxydant et thermo-oxydant (*Al35pH10*, *Tha35t140*, *O35c0.01* et *Tho35c0.01*), soit de 0,85 à 30 fois plus que le contrôle. La concentration du S en phase soluble peut augmenter dans les BES pour les mêmes raisons que les BEM, mais la plus faible augmentation a été observée avec l'hydrolyse acide (+85%). Le K dissous diminue légèrement dans les BES après tous les traitements de 5% à 12%, à l'exception du traitement thermo-oxydant qui ne l'influence pas (+2%). La teneur en Mg dans la phase soluble subit d'importants changements dans les BES suite aux traitements. Elle augmente considérablement avec l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) et les traitements oxydants (*O35c0.01* et *Tho35c0.01*) de 44% à 74%.

Toutefois, elle diminue avec les autres traitements (*Ac35pH2*, *Th35t140* et *Tha35t140*) de 41% à 89%.

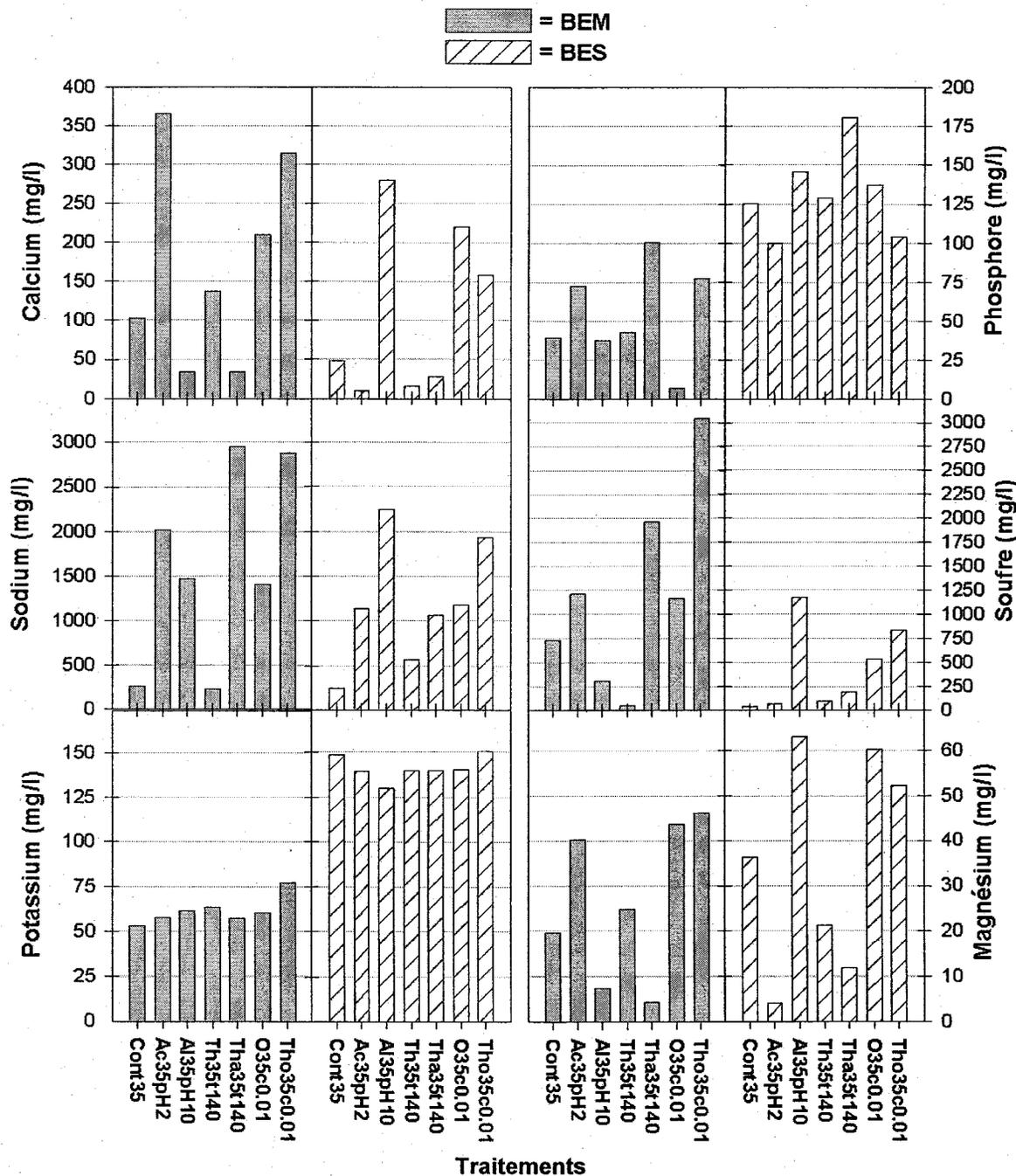


Figure 14 Effets des traitements sur la solubilisation de différents éléments inorganiques présents dans les boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).

5.2.6 Influence sur les MES et MVES

Les effets des traitements sur les MES et les MVES des boues sont présentés à la Figure 15.

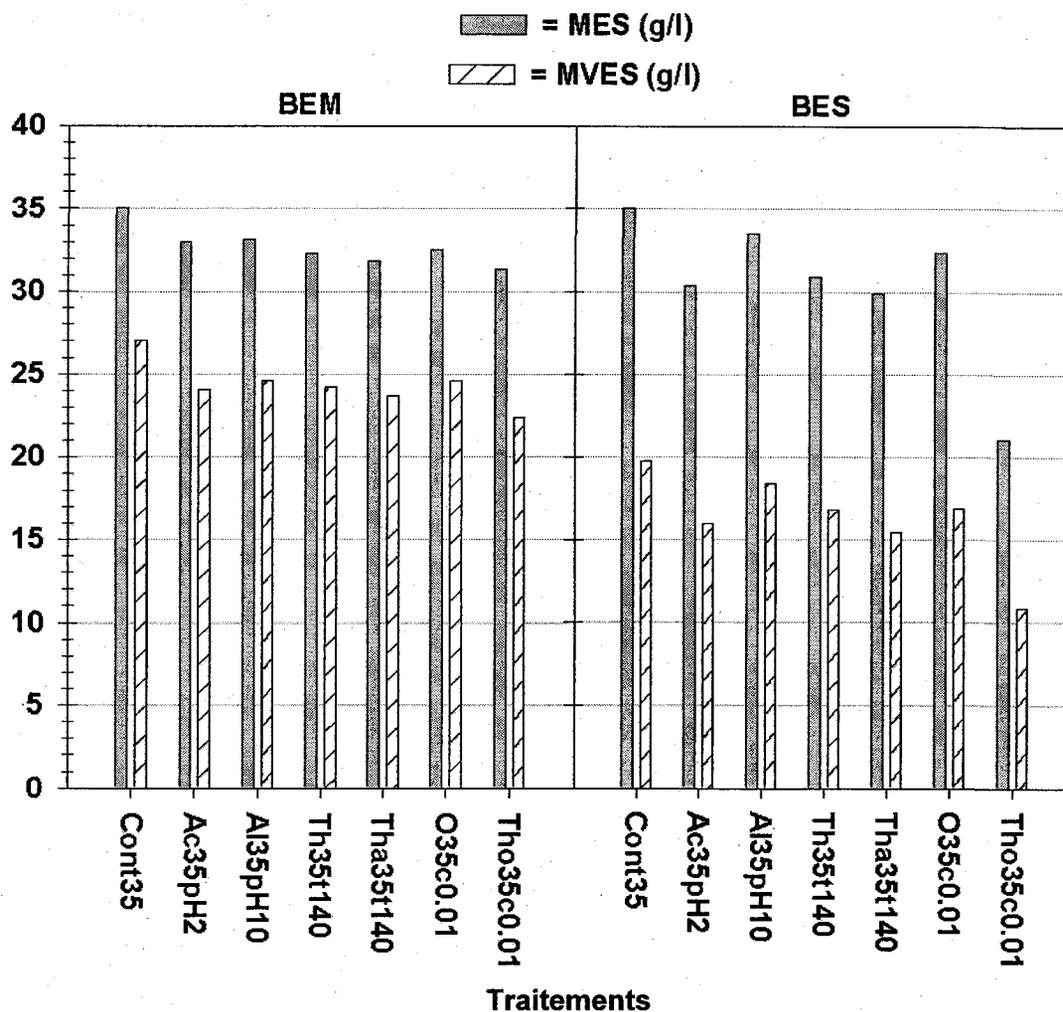


Figure 15 Effets des traitements sur les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES) contenues dans les boues mixtes (BEM) et secondaires (BES).

Selon la Figure 15, les traitements ont très peu d'effet sur la concentration des MES des BEM (moins de 10% de différence par rapport au contrôle). Cette observation suggère une faible solubilisation de la matière organique et décomposition des particules solides. Il en est de même pour les MVES (moins de 17%), ce qui suggère aussi une faible solubilisation de la matière organique. Seule l'application du traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) sur les BEM diminue approximativement les MVES de 17%.

Pour les BES, le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) et l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) diminuent de 15% et plus les MES et les MVES. Les autres traitements ont peu ou très peu d'effet sur la concentration des MES et MVES des BES (entre 4% à 19% de différence par rapport au contrôle).

5.3 Discussion

Plusieurs traitements des boues parviennent à accroître simultanément le nombre de spores produites et l'entomotoxicité de Btk HD-1. Certains auteurs affirment qu'une augmentation de spores peut entraîner une augmentation de l'entomotoxicité (voir Annexe 3). D'autres chercheurs ont démontré que la composition du milieu de culture influence l'entomotoxicité de Bt, soit au niveau de la sporulation (voir Tableau 2, p. 23) ou de la formation de métabolites insecticides comme les CPI (voir Tableau 3, p. 27). Les augmentations en entomotoxicité de Btk HD-1 dans les boues traitées peuvent être attribués à un effet direct des nouvelles caractéristiques des boues sur la production de spores et de métabolites insecticides. Si la sporulation est induite, les augmentations pourraient être attribués à un effet indirect des mécanismes liés à la sporulation sur la formation des cristaux ou autres métabolites insecticides.

Les résultats des effets des traitements indiquent clairement que les caractéristiques du milieu influencent le nombre de spores produites et l'entomotoxicité. Selon les figures 6 et 7, le nombre de spores et l'entomotoxicité pour un même traitement sont différents à 25 g MES/l et à 35 g MES/l. Les caractéristiques rhéologiques des boues plus concentrées en MES expliquent en partie ces différences (voir sections 1.2.3.2 et 2.2.2.2). Toutefois, la concentration des éléments organiques et inorganiques est un autre facteur expliquant ces différences. Les boues contenant 35 g MES/l ont des caractéristiques différentes de celles contenant 25 g MES/l car la concentration des éléments organiques et inorganiques varie selon la quantité de MES. Les rendements de Btk HD-1 varient aussi selon les paramètres d'un traitement. Par exemple, l'application d'une hydrolyse thermo-alkaline à diverses températures (140°C, 160°C, 180°C) sur des BEM à 25 g MES/l donne différentes entomotoxicités ($16,2 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$, $14,9 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ et $10,5 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). Cela suggère que les modifications faites au milieu diffèrent d'une température à l'autre. Pour l'instant, il n'est pas possible de vérifier les effets des paramètres des traitements et les effets des traitements en fonction de différentes MES car un seul essai a été testé pour chaque traitement. Il serait souhaitable dans des travaux ultérieurs d'explorer plus en détails ces effets pour expliquer les observations.

Les effets d'un traitement diffèrent selon le type de boue. Les caractéristiques initiales des BEM et des BES expliquent les différences pour un même traitement. Les principaux constituants des boues, soit la matière organique pour les BEM et les cellules microbiennes pour les BES, répondent différemment aux traitements. Comme la composition du milieu a une influence sur l'entomotoxicité, il est normal que le rendement de Btk HD-1 dans les BEM traitées soit différent de celui dans les BES ayant subies le même traitement.

Les modifications faites au milieu ont des effets favorables ou défavorables sur la croissance, la sporulation et la production de métabolites secondaires de Btk HD-1. Les effets peuvent se combiner, s'atténuer ou même s'annuler. Par exemple, la solubilisation de composés inorganiques peut libérer des éléments traces qui stimulent la production de spores et de CPI, mais elle peut également déstabiliser la balance ionique du milieu. La balance ionique est très importante pour la production de métabolites secondaires comme les CPI dans les milieux complexes (Içgen et al., 2002a). La carence ou le surplus d'un ou plusieurs éléments inorganiques provoquent des altérations brusques entre la formation de métabolites secondaires et/ou la formation de spores sans même affecter la croissance de la bactérie. Dans ce travail, ce phénomène est très important puisque l'entomotoxicité de Btk HD-1 est largement tributaire à la présence de métabolites secondaires insecticides dans le bouillon fermenté.

Les résultats montrent que les changements en MES et MVES après les traitements sont de faibles intensités. Néanmoins, ces changements sont suffisants pour occasionner des augmentations du nombre de spores produites et d'entomotoxicité dans plusieurs cas. Les structures des MES et des MVES sont modifiées de telle sorte que le travail enzymatique de la bactérie requiert moins d'énergie pour les dégrader et leur soutirer des éléments nutritifs.

Le ratio C/N est un important paramètre pour la production de Bt dans des milieux alternatifs. Dans ce travail, les traitements diminuent de 2 unités le ratio C/N des BEM tandis qu'ils modifient faiblement celui des BES. Ces faibles variations peuvent néanmoins influencer le rendement de Bt dans les boues. Il serait intéressant d'explorer davantage le potentiel des traitements à modifier le ratio C/N, sans apport exogène d'élément nutritif, pour améliorer le rendement des procédés biologiques comme la production de Bt dans des milieux alternatifs. Des recherches pourraient se poursuivre sur les traitements provoquant la volatilisation des molécules de carbone ou d'azote.

Un ratio $Tx/spores$ a été calculé pour chaque expérience. Ce ratio est un indice de l'entomotoxicité globale du bouillon fermenté en fonction des spores produites. Une valeur accrue du ratio $Tx/spores$ suggère une plus forte entomotoxicité des spores. Cependant, une réduction du ratio

Tx/spores est constatée dans la presque totalité des boues traitées par rapport aux boues non traitées. Les spores produites sont peut-être moins entomotoxiques. Néanmoins, elles peuvent être autant ou plus toxiques dans les cas où une plus grande production de métabolites insecticides et/ou la formation de métabolites plus performants (en terme de pouvoir insecticide) sont survenues. Ces hypothèses sont discutées plus en détails dans la section 6.3.1.2.

Dans plusieurs cas, un accroissement du nombre de spores produites n'augmente pas nécessairement l'entomotoxicité. À titre d'exemple avec les BEM, $9,5 \times 10^7$ UFC/ml sont obtenus avec *Cont25* vis-à-vis $2,2 \times 10^8$ UFC/ml avec *Cont35*. Les spores sont un élément entomotoxique de Btk HD-1 parmi plusieurs autres (CPI, PIV, chitinases...). Si ces autres éléments étaient fabriqués en faible quantité, l'entomotoxicité associée à un nombre de spores plus élevée ne peut atteindre le niveau escompté en raison de la synergie entre les spores et les autres éléments entomotoxiques qui serait plus faible dans ces circonstances. Il est possible aussi que les spores soient immatures et moins entomotoxiques. Le ratio *Tx/spores* a justement été calculé pour vérifier cette possibilité.

Les prochaines sous-sections discutent les effets de chaque traitement sur les BEM et les BES de manière à déceler le facteur ou la combinaison de facteurs qui expliquent les augmentations de spores produites et d'entomotoxicité de Btk HD-1. L'accent est mis sur les expériences préliminaires dont les traitements ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques (*Ac35pH2*, *Al35pH10*, *Th35t140*, *Tha35t140*, *O35c0.01* et *Tho35c0.01*) en comparaison avec le contrôle *Cont35*.

Signalons que les données de ce chapitre sont insuffisantes pour se prononcer sur les effets des paramètres des traitements (durée, température, pH ou $[H_2O_2]$) sur le rendement de Bt. Quelques suggestions sont faites dans le texte, mais les effets sont discutés plus en détails avec les travaux d'optimisation qui étudient de larges intervalles pour chacun des paramètres (chapitre 6).

5.3.1 Effets de l'hydrolyse acide

5.3.1.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH acide

Selon les résultats, l'hydrolyse acide ne permet pas de dépasser l'entomotoxicité du contrôle *Cont25* avec *Ac25pH2* et *Ac25pH4*, mais l'augmente de 23% et 30% avec *Ac35pH2* et *Ac35pH4* respectivement. L'hydrolyse à pH 2 (*Ac35pH2*) augmente considérablement le COD par rapport au contrôle (+62%). Cela suggère que les éléments solubilisés ou simplifiés suite à l'hydrolyse acide

de la matière organique des BEM accroissent l'entomotoxicité de Btk HD-1 lorsque les boues sont plus concentrées en MES.

Une seconde comparaison peut être avec le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*). Selon les analyses sur *Ac35pH2*, l'hydrolyse acide des BEM augmente le COD (Figure 8) et la teneur en Na, Ca, P, Mn et Mg dans la phase soluble (figures 13 et 14). Ces molécules sont convoitées pour la sporulation et la formation de métabolites insecticides de Bt (voir tableaux 2 et 3, p. 23 et 27). Pourtant, les augmentations de l'entomotoxicité et du nombre de spores ne sont pas aussi élevés que le traitement thermo-oxydant (*Tho35c0.01*) avec lequel les teneurs en COD, Na, Ca, P, Mn et Mg augmentent également dans la phase soluble. L'augmentation des teneurs en Mo et du Zn augmentent avec ces deux traitements. Le faible rendement de *Ac35pH2* pourrait être attribué à la solubilisation du Mo et du Zn, soit deux éléments traces susceptibles d'interférer avec les mécanismes physiologiques de Bt (tableaux 2 et 3). La solubilisation du Mo et Zn ne semble cependant pas avoir affecté Btk HD-1 avec *Tho35c0.01* car un meilleur rendement. De plus, le contenu en protéines dissoutes est plus élevé avec *Tho35c0.01* tandis que *Ac35pH2* ne parvient pas à dissoudre les protéines (-15%). Pour *Ac35pH2*, ce facteur peut contrecarrer les effets favorables d'une solubilisation accrue du carbone organique, Na, Ca, P, Mn et Mg tels qu'observés avec *Tho35c0.01*.

5.3.1.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH acide

L'hydrolyse acide des BES permet à Btk HD-1 d'augmenter le nombre de spores produites (>50%). L'entomotoxicité augmente dans quelques cas (+27% pour *Ac35pH2* et +45% pour *Ac35pH4*), mais elle demeure inférieure à celle mesurée lors des traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant. Les résultats indiquent que l'hydrolyse acide diminue le contenu en Mn, Ca, P et Mg dans la phase soluble des BES. Ces éléments sont importants pour la sporulation et la production de métabolites secondaires. Dans ce cas-ci, ces éléments solubles peuvent avoir été utilisés en majorité pour la formation des spores et sont devenus un facteur limitant pour la production de CPI (ou autres métabolites insecticides) en raison de leurs faibles teneurs. Cela a eu pour effet de limiter l'augmentation de l'entomotoxicité par le traitement. Bien que Btk HD-1 puisse recourir à ses enzymes pour récupérer ces éléments en phase solide, ce n'était pas suffisant pour augmenter l'entomotoxicité.

L'hydrolyse acide diminue C_t , COD, %MVES dégradées après 5 jours, N_t et l'azote organique par rapport au contrôle. Malgré ces diminutions, les entomotoxicités de *Ac35pH2* ($9,7 \times 10^3$ UI/ μ l) et

Ac35pH4 ($11,2 \times 10^3$ UI/ μ l) sont plus élevées que le contrôle *Cont35* ($7,7 \times 10^3$ UI/ μ l). Le contenu en protéines solubles n'a cependant pas varié. La présence de protéines solubles modifiées (ou simplifiées) dans les BES à forte teneur en MES pourrait favoriser la production de métabolites insecticides à base d'azote.

Malgré des variations différentes des caractéristiques physico-chimiques, Btk HD-1 atteint des entomotoxicités de même ordre dans les BEM traitées ($8,9 \times 10^3$ à $10,7 \times 10^3$ UI/ μ l) et les BES traitées ($9,7 \times 10^3$ à $11,2 \times 10^3$ UI/ μ l). L'hydrolyse acide est le traitement qui solubilise le moins de protéines. Les protéines solubles sont des sources d'acides aminés susceptibles de stimuler la formation de métabolites insecticides comme les CPI (voir Tableau 3, p.27). Dans ce cas-ci, elles ne semblent pas en quantité suffisante pour accroître considérablement l'entomotoxicité de Btk HD-1.

5.3.2 Effets de l'hydrolyse alcaline

5.3.2.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH alcalin

L'hydrolyse alcaline augmente le contenu en protéines dissoutes de 87% par rapport au contrôle. De même, elle libère une grande quantité de $N-NH_4^+$ (+178%) sans affecter le N_t (-10%). Ces résultats montrent que l'hydrolyse alcaline a une influence considérable sur la fraction azoté de la matière organique des BEM. Cela peut expliquer les bons résultats de *Al35pH10* où les protéines solubilisées ont bénéficié aux processus de sporulation ($3,9 \times 10^8$ spores/ml) et de formation de métabolites insecticides ($11,9 \times 10^3$ UI/ μ l) en comparaison avec le contrôle *Cont35* (2,2 spores/ml et $8,3 \times 10^3$ UI/ μ l).

Cette hydrolyse diminue les teneurs en phase soluble de trois éléments inorganiques importants pour la sporulation et la formation des métabolites insecticides (Ca, Mg et Mn). Cependant, elle solubilise des éléments inorganiques non désirés (Cu, Mo et Zn). Malgré ces variations, leur teneur dans le milieu semble adéquate pour la production de métabolites insecticides par Btk HD-1 car le rendement en entomotoxicité de *Al35pH10* n'est pas affecté (+45% par rapport à *Cont35*).

En comparant avec l'hydrolyse acide des BEM à 35 g MES/l (*Ac35pH2*), l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*) donne une meilleure entomotoxicité ($11,9 \times 10^3$ UI/ μ l vis-à-vis $10,1 \times 10^3$ UI/ μ l). Elle se différencie de l'hydrolyse acide avec l'augmentation du contenu en protéines dissoutes et du Cu ainsi que de la diminution du Ca, Mg et Mn dans les BEM. La variation en protéines dissoutes est susceptible de favoriser la formation de métabolites insecticides. Cette variation semble atténuer les effets potentiellement néfastes d'une augmentation du Cu et d'une diminution du Ca, Mg et Mn

dans la phase soluble. Les mêmes variations ont été observées avec l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) et l'entomotoxicité observée est beaucoup plus élevée ($19,1 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). Les teneurs plus élevées de P inorganique et de N-NH_4^+ en phase soluble avec *Tha35t140* sont peut-être responsables de la forte entomotoxicité. Ces deux éléments peuvent jouer un rôle important dans la fabrication des métabolites insecticides. Ce sont des vecteurs essentiels pour le transfert d'énergie (P inorganique) ou pour la fabrication d'acides aminés (N-NH_4^+).

5.3.2.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH alcalin

En comparaison avec les BEM, l'hydrolyse alcaline agit différemment sur les composés azotés des BES : elle diminue le N-NH_4^+ et le N_t . Le N-NH_4^+ s'est volatilisé sous forme de N-NH_3 , ce qui diminue par la suite N_t .

Bien que l'hydrolyse alcaline diminue la quantité d'azote dans les BES, elle augmente leur contenu en protéines dissoutes. Les BES sont constituées majoritairement de cellules microbiennes et de débris cellulaires. Ces observations suggèrent que l'hydrolyse alcaline lyse les cellules et brise leurs membranes pour libérer plus de protéines. Ces protéines ont déjà la conformité métabolique appropriée pour être assimilées rapidement par voie microbienne ou dégradées par des protéases extracellulaires. Les composants de ces protéines ont possiblement contribué à la stimulation et à la production de métabolites insecticides. De plus, l'ion sodium, présent en grande quantité dans le milieu après l'hydrolyse alcaline, peut jouer un rôle important dans l'assimilation de ces protéines en influençant leur solubilité (Morris et al., 1996 ; Zaouri et Jaoua, 1999b). L'effet bénéfique de cette hydrolyse sur les protéines et leur assimilation expliquerait en partie pourquoi Btk HD-1 atteint une très forte entomotoxicité ($18,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) dans ce milieu.

Une plus grande quantité d'éléments inorganiques se retrouve dans la phase dissoute des BES après l'hydrolyse alcaline en comparaison avec les BEM. Cela est particulièrement le cas pour Ca, Mn, Mg, Cu et S. Une plus faible solubilisation du Mo et une diminution de Al en phase soluble sont aussi observées. Combinée à l'augmentation des protéines dissoutes et la libération de protéines plus appropriées pour la prise en charge bactérienne, la solubilisation du Ca, Mn et Mg crée des conditions idéales pour la production de métabolites insecticides en grande quantité ou/et plus performants en terme d'entomotoxicité.

À 25 g MES/l, l'hydrolyse alcaline à pH 10 des BES (*Al25pH10*) donne un rendement inférieur en entomotoxicité ($11,0 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) en comparaison avec 35 g MES/l. Les BES ajustées à 25 g MES/l ne contiennent pas autant de cellules microbiennes à lyser. Étant donné l'importance des composés

azotés libérés ou modifiés par l'hydrolyse alcaline sur l'entomotoxicité, la baisse peut s'expliquer en partie par la plus faible quantité de protéines libérées ou modifiées à 25 g MES/l.

L'hydrolyse à pH 12 des BES offre à Btk HD-1 des conditions de culture différentes et la bactérie ne parvient pas à atteindre une entomotoxicité aussi élevée ($8,5 \times 10^3$ UI/ μ l pour *Al25pH12* et $9,3 \times 10^3$ UI/ μ l pour *Al35pH12*). Une forte hydrolyse dissout davantage d'éléments organiques et inorganiques. Toutefois, elle peut modifier la conformité métabolique des protéines de sorte qu'elles demandent un travail biochimique plus important pour être assimilées ou qu'elles soient inaptes à la prise en charge bactérienne. L'effet du pH de l'hydrolyse alcaline des BES est également discuté dans la section 6.2.6.

5.3.3 Effets de l'hydrolyse thermique

5.3.3.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à température élevée

Les résultats obtenus sur l'hydrolyse thermique des BEM (*Th25t140*, *Th25t160*...) montrent une diminution de l'entomotoxicité (-12% à -60% par rapport aux contrôles *Cont25* et *Cont35*) sans affecter la production de spores (+9% à +250%). Les baisses d'entomotoxicité peuvent s'expliquer par la formation de composés réfractaires (ex. : produits de la réaction de Maillard) qui interfèrent avec les processus de production de métabolites insecticides. Toutefois, si des composés réfractaires sont présents, ils n'affectent pas la biodégradabilité car les microorganismes, présents dans l'inoculum de boues fraîches, ont dégradé une plus grande quantité de MVES dégradées après 5 jours que les autres traitements étudiés (voir Figure 9).

Les baisses d'entomotoxicité peuvent s'expliquer par la détérioration du milieu. Signalons que les boues hydrolysées ont subi une stérilisation avant leur analyse. Cette stérilisation est apparemment une deuxième hydrolyse thermique (121°C) à pH neutre qui est susceptible de détériorer le milieu de culture. Les instruments pour l'hydrolyse thermique (et les autres traitements à l'étude) ne permettaient pas de manipuler aseptiquement les boues suite à leur hydrolyse. C'est pourquoi il était nécessaire de stériliser les boues avant leur fermentation. Dans ce travail, la stérilisation était effectuée dans un autoclave alors que l'hydrolyse thermique a été réalisée dans un digesteur à micro-onde. Très peu d'auteurs ont publié des travaux sur l'hydrolyse thermique à l'autoclave⁸⁴. À

⁸⁴ Brown et Lester (1980) affirment que l'autoclave est la méthode la plus efficace pour extraire les PEC des boues activées et que ce type d'hydrolyse ne brise pas autant de cellules que l'addition de EDTA et de NaOH. Selon Ito et al. (2000), pour le Cd, le Cr, le Cu, le Fe, le Mn, le Ni, le Pb et le Zn, seul le Ni a été solubilisé (+20%) lors d'une hydrolyse thermique à l'autoclave (100°C, 30 min.).

notre connaissance, la détérioration du milieu par la stérilisation n'est pas documentée, à l'exception des produits potentiels des réactions de Maillard entre les sources de carbone et d'azote. Dans le cas présent, peu de protéines ont été solubilisées dans les BEM (+30% par rapport au contrôle) et les éléments inorganiques Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Ca, K et Mg augmentent dans la phase soluble (de 20% à 450%). Ces variations sont le résultat de deux hydrolyses thermiques à pH neutre. En cumulant leurs effets à ceux des composés réfractaires sur la production de métabolites insecticides (s'il y a lieu), les conditions de culture affectent de manière significative le rendement de Bt en terme d'entomotoxicité (de -12% à -60% par rapport au contrôle). Il serait souhaitable dans des travaux ultérieurs de répéter les expériences sur les effets des traitements, sans phase de stérilisation, et les comparer avec ce travail pour évaluer les effets de la stérilisation sur la composition des boues (traitées ou non).

Beaucoup d'éléments inorganiques ont été solubilisés dont Mg, Mn et Ca avec *Th35t140*. Ces trois éléments favorisent la sporulation et l'entomotoxicité. Comme une basse entomotoxicité a été observée avec *Th35t140* (-35% par rapport au *Cont35*), cela suggère que d'autres facteurs bénéfiques soient manquants comme une augmentation marquée des protéines dissoutes et une forte teneur en Na dans la phase soluble. Une comparaison intéressante peut être faite avec l'hydrolyse alcaline des BEM (*Al35pH10*) où une meilleure entomotoxicité est observée ($12,0 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). L'hydrolyse alcaline diminue les éléments Mg, Mn et Ca en phase soluble, et solubilise de façon importante les protéines dissoutes ainsi que le Na. Les teneurs en Ca (34,2 mg/l), Mg (7,5 mg/l) et Mn (0,1 mg/l) des BEM après l'hydrolyse alcaline semblent malgré tout suffisantes pour que Btk HD-1 augmente son entomotoxicité (+45% par rapport au *Cont35*). Des diminutions acceptables de Ca, Mg et Mn en phase soluble n'affectent pas Btk HD-1 si de fortes teneurs en protéines dissoutes et Na caractérisent le milieu.

Lorsque l'hydrolyse thermique est effectuée à pH alcalin (*Tha35t140*), le COD et la teneur en protéines dissoutes augmentent considérablement et une très forte entomotoxicité est observée ($19,1 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). Cela n'est pas le cas pour l'hydrolyse thermique à pH neutre. De meilleures concentrations en carbone organique et protéines dissoutes fourniraient de biens meilleures conditions de culture pour la formation de métabolites insecticides.

Dans tous les traitements, la plus faible teneur du Na en phase soluble a été observée avec *Th35t140* appliquée sur les BEM ($2,3 \times 10^2 \text{mg/l}$, soit 10% de moins que le contrôle). La présence d'une plus grande quantité de Na serait susceptible de favoriser la solubilité des protéines et leur assimilation par Btk HD-1. Ces protéines et leurs produits de dégradation stimuleraient la

production de métabolites insecticides. La teneur du Na en phase soluble dépend entre autres de la quantité de NaOH utilisée pour réaliser les hydrolyses alcalines et/ou réajuster le pH avant la stérilisation. En comparaison avec *Al35pH10* et *Tha35t140*, *Th35t140* est réalisée à pH 7 et requiert seulement du NaOH avant la stérilisation. C'est pourquoi il y a moins de Na en phase soluble dans *Th35t140*. La présence d'une plus grande quantité de Na en phase soluble expliquerait aussi les fortes entomotoxicités observées avec *Al35pH10* et *Tha35t140*.

L'hydrolyse thermique diminue peu la viscosité des BEM (-13% par rapport au contrôle) et cela peut expliquer les faibles entomotoxicités observées. La diffusion et le transfert de l'oxygène dans le milieu s'effectuent plus difficilement par rapport rapport aux autres traitements où de meilleures entomotoxicités sont observées. Selon Lachaab (2001) et Vidyarthi et al. (2002), des teneurs supérieures à 25 g MES/l dans les boues affectent l'entomotoxicité de Btk HD-1 en raison de la viscosité plus élevée. L'hydrolyse thermique ne parvient pas à contourner ce problème. Cela semble avoir une conséquence sur l'entomotoxicité, mais pas sur la production de spores. Une baisse importante de la viscosité favoriserait la production de métabolites insecticides en améliorant le transfert de l'oxygène essentiel aux processus énergétiques et en réduisant les interférences potentielles des particules avec les mécanismes de production.

Malgré les faibles entomotoxicités observées avec l'hydrolyse thermique (*Tha25t140*, *Tha25t160*...), le système de sporulation n'est pas affecté. Bien au contraire, le nombre de spores produites augmente de manière considérable dans plusieurs cas. L'hydrolyse thermique des BEM offre des conditions favorables à la production de spores par Btk HD-1. Selon les résultats de *Th35t140*, très peu de sources de carbone sont solubilisés (+7% par rapport au *Cont35*) et le contenu en N-NH₄⁺ diminue (-21%). Certaines sources de carbone en phase soluble et les ions ammonium provoqueraient une répression catabolique du processus de la sporulation. Le phénomène de la répression catabolique était peut-être moins important et la phase de sporulation a commencé tôt. L'hydrolyse thermique des BEM offre clairement des conditions favorables à la production de spores, mais non à la production de métabolites insecticides.

5.3.3.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à température élevée

En comparaison avec les BEM, l'hydrolyse thermique des BES a un effet plus positif sur le rendement de Btk HD-1. Elle entraîne une forte production de spores dans toutes les expériences (113% à 257% par rapport aux *Cont25* et *Cont35*), mais elle augmente seulement l'entomotoxicité à 35 g MES/l (+21% avec *Th35t140* et +39% avec *Th35t160*). L'augmentation considérable de la concentration en protéines dissoutes avec *Th35t140* (+141% par rapport au *Cont35*) contribue à

accroître le rendement de Btk HD-1. Il est possible aussi que l'hydrolyse thermique des BES forme moins de composés réfractaires pour la sporulation et la formation de métabolites insecticides par rapport aux BEM en raison de l'absence de matière complexe (ex. : matière lignocellulosique) susceptible de libérer des composés inhibiteurs suite à l'hydrolyse.

Les augmentations d'entomotoxicité (+21%) ne sont pas aussi marquées que les traitements alcalin (+140%), thermo-alcalin (+65%) et thermo-oxydant (+91%). Le maintien de la teneur en COD limite peut-être le degré d'augmentation.

En comparant avec l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*), l'hydrolyse thermique des BES (*Th35t140*) diminue la teneur en éléments inorganiques solubles à l'exception du Mo, Na et S. Il y a entre autres moins de Ca, Mg et Mn dissous dans les BES hydrolysées à haute température. Ces trois éléments organiques sont importants pour les processus de production de métabolites insecticides. Leur faible teneur dans le milieu de fermentation semble affecter l'entomotoxicité de Btk HD-1. L'hydrolyse acide des BES (*Ac35pH2*) provoque également une diminution prononcée de ces trois éléments. Ces faibles teneurs limitent peut-être la production de métabolites insecticides, ce qui expliquerait les valeurs d'entomotoxicité de même ordre ($9,7 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ pour *Ac35pH2* et $9,3 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ pour *Th35t140*).

Finalement, l'hydrolyse à très haute température (180°C) ne crée pas des conditions favorables à la formation de métabolites secondaires insecticides dans les BES contenant 25 ou 35 g MES/l (expériences *Th25t180* et *Th35t180*). Cette observation suggère que des composés réfractaires formés durant cette forte hydrolyse interfèrent avec leurs systèmes de production.

5.3.4 Effets de l'hydrolyse thermo-alcaline

5.3.4.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées à pH alcalin et température élevée

Les hautes températures amplifient les effets de l'hydrolyse alcaline comme en témoignent les fortes valeurs de COD et de protéines dissoutes obtenues suite à l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM (et des BES). Les effets sont probants et Btk HD-1 en profite pleinement pour produire un nombre élevé de spores (de 2,0 à $4,3 \times 10^8$ spores/ml) et atteindre de très fortes entomotoxicités (jusqu'à $19,1 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). En plus de la solubilisation d'éléments nutritifs, l'hydrolyse thermo-alcaline affaiblit les liens moléculaires des composés complexes. Ces molécules deviennent alors plus vulnérables aux réactions enzymatiques. La bactérie accède alors à une plus grande quantité de molécules qui stimulent la formation de spores et de métabolites insecticides.

En comparant l'hydrolyse thermo-alkaline (*Tha35t140*) avec l'hydrolyse alcaline (*Al35pH10*), les variations des caractéristiques physico-chimiques des boues diffèrent peu, à l'exception du niveau de N-NH_4^+ qui diminue (-37% par rapport au contrôle) et de Na qui est très élevé ($3,0 \times 10^3 \text{ mg/l}$ pour *Tha35t140* vis-à-vis $1,5 \times 10^3 \text{ mg/l}$ pour *Al35pH10*). Il est possible que le N-NH_4^+ , présent dans les boues ou formé durant l'hydrolyse, se soit volatilisé suite au traitement. Une diminution du N_t a d'ailleurs été observée, ce qui appuie l'hypothèse d'une perte d'azote par volatilisation. L'hydrolyse *Tha35t140* a dissout et dégradé des protéines libres ou adsorbées sur les MES. Ces dernières n'ont pas été dissoutes et hydrolysées complètement en N-NH_4^+ . Cette observation suggère une modification des protéines qui les a rendues plus sensibles aux réactions enzymatiques. Le travail enzymatique de Btk HD-1 durant la fermentation a permis de dissoudre ces protéines modifiées et/ou de les transformer en acides aminés. Cela aurait permis de produire des métabolites secondaires en grande quantité ou plus performants en terme de pouvoir insecticide pour alors augmenter l'entomotoxicité. La forte teneur en Na dans la phase soluble peut certainement avoir contribué aux excellents rendements de Btk HD-1 en favorisant la solubilité des protéines et leur accessibilité subséquente pour les enzymes bactériennes. Sa grande concentration s'explique par la méthode d'hydrolyse qui nécessitait plusieurs ajustements de pH avec une solution de NaOH.

Une forte hydrolyse thermo-alkaline à 180°C (*Tha25t180* et *Tha35t180*) diminue le rendement de Btk HD-1 en terme d'entomotoxicité par rapport à celles réalisées à 140 et 160°C . Cette observation peut s'expliquer par la formation de molécules réfractaires susceptibles d'interférer avec les processus de production des métabolites secondaires. Cependant, ce phénomène est atténué en milieu alcalin car les entomotoxicités sont plus élevées que les hydrolyses thermiques à pH neutre (*Th25t140*, *Th25t160*, ...).

5.3.4.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées à pH alcalin et température élevée

L'hydrolyse thermo-alkaline permet d'obtenir de très bons rendements en spores (plus de 3×10^8 spores/ml) ainsi qu'en entomotoxicité (jusqu'à $12,6 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$). Toutefois, elle ne permet pas d'atteindre une entomotoxicité aussi élevée que l'hydrolyse alcaline ($18,4 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$ pour *Al35pH10* vis-à-vis $12,6 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$ pour *Tha35t140*). Le COD et le contenu en protéines dissoutes des BES ont augmenté suite à l'hydrolyse thermo-alkaline. L'augmentation en protéines dissoutes est très élevée (+414%). Par rapport à l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM (*Tha35t140*) et à l'hydrolyse alcaline des BES (*Al35pH10*), le pourcentage de MVES dégradées après 5 jours et la

teneur en Na sont inférieurs. Une augmentation marquée de ces deux paramètres aurait davantage accru le rendement de Btk HD-1 en combinaison avec la quantité abondante de protéines dissoutes observée.

Par rapport aux BEM ayant subies la même hydrolyse (*Tha35t140*), le rendement en spores est supérieur dans les BES, mais les valeurs d'entomotoxicité sont moins élevées. Les conditions de culture n'ont pas nécessairement favorisé la sporulation de Btk HD-1 (87% et 71% de sporulation dans les BEM et BES respectivement). Btk HD-1 peut avoir produit moins de métabolites secondaires extracellulaires contribuant à son pouvoir insecticide. En plus du pourcentage de MVES dégradés après 5 jours et la teneur en Na dans la phase soluble qui sont inférieurs, les teneurs en ions Cu^{2+} et Mn^{2+} ainsi que de S dissous des BES sont supérieures à celles des BEM ayant subies l'hydrolyse *Tha35t140*. Les augmentations de ces ions ne sont pas suffisantes pour que Btk HD-1 atteigne des rendements équivalents dans les BES en terme d'entomotoxicité.

Par rapport à l'hydrolyse alcaline des BES (*Al35pH10*), l'hydrolyse *Tha35t140* n'augmente pas la concentration en Ca et Mg dans la phase soluble. Si l'application de *Tha35t140* solubilisait davantage de Ca et de Mg, cela aurait stimulé la production de métabolites insecticides et l'entomotoxicité aurait peut-être atteint des valeurs supérieures à $12,6 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$.

5.3.5 Effets du traitement oxydant

5.3.5.1 Fermentation des boues mixtes oxydées partiellement

Le traitement oxydant des BEM (*O35c0.01*) a des conséquences néfastes sur le rendement de Btk HD-1 lorsqu'une trop grande quantité d'agent oxydant est utilisée. Les rendements sont très faibles avec une quantité élevée de H_2O_2 (0,05 ml/g MES), indépendamment de la concentration en MES. Si l'agent oxydant n'est pas totalement utilisé, l'excès de H_2O_2 pourrait interférer avec le métabolisme bactérien, mais Btk HD-1 secrète des catalases pour dégrader cet élément toxique. En diminuant la concentration d'agent oxydant (0,01 et 0,03 ml/g MES), les rendements en spores et en entomotoxicité sont équivalents ou supérieurs aux contrôles. Malgré cela, les hausses de rendement ne sont pas aussi marquées que celles observées avec les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant. La présence de sous-produits d'oxydation toxiques dans les boues partiellement oxydées pourrait interférer avec les processus de sporulation et de formation des métabolites secondaires insecticides.

Par rapport aux autres traitements, le traitement oxydant solubilise très peu les éléments inorganiques contenus dans les BEM (et les BES), à l'exception de la teneur en Mg qui augmente. Le traitement oxydant des BEM a également peu d'effet sur le COD, les protéines dissoutes, et N-NH_4^+ . Malgré la faible solubilisation des BEM, le traitement oxydant permet à Btk HD-1 de produire plus de spores (+80%) et d'atteindre une meilleure entomotoxicité (+39%) par rapport au contrôle. La dégradation de la matière organique en molécules plus simples et la diminution subséquente de la viscosité (-45% par rapport au contrôle) peuvent améliorer les conditions de culture de Btk HD-1. Cependant, ces changements ne sont pas suffisants pour que Btk HD-1 atteigne des rendements aussi bons que les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant.

5.3.5.2 Fermentation des boues secondaires oxydées partiellement

Une oxydation douce des BES (0,01 ml $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ MES) permet à Btk HD-1 de produire une grande quantité de spores et d'obtenir des entomotoxicités équivalentes ou légèrement supérieures au contrôle. L'oxydation douce n'offre pas à Btk HD-1 des conditions de culture aussi bonnes que les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant. L'utilisation d'une forte quantité de H_2O_2 (0,05 ml $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ MES) affecte considérablement la production de spores et l'entomotoxicité pour les mêmes raisons expliquées dans la sous-section précédente.

En comparant avec les BEM, le traitement oxydant des BES diminue la viscosité et affecte peu le COD alors qu'il dissout une plus grande quantité de protéines. Il solubilise beaucoup plus Cu, Mn, Ca et S, et n'affecte pas la teneur en P inorganique dissous. Le traitement oxydant a un effet plus important sur les BES que les BEM en raison des cellules microbiennes qui sont un constituant majeur des BES. Les cellules microbiennes sont moins complexes et plus susceptibles aux réactions d'oxydation que la matière organique prédominante des BEM. Malgré une meilleure solubilisation des BES par rapport aux BEM, Btk HD-1 ne produit pas plus de spores et n'atteint pas de meilleures entomotoxicités. La présence d'agent oxydant non utilisé et de produits d'oxydation toxiques pourraient interférer avec la sporulation et la production de métabolites insecticides.

5.3.6 Effets du traitement thermo-oxydant

5.3.6.1 Fermentation des boues mixtes hydrolysées et oxydées partiellement

L'hydrolyse des BEM avant une oxydation douce (0,01 ml $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ MES) permet d'accroître les rendements de Btk HD-1 et ce, de manière considérable lorsque les BEM contiennent 35 g MES/l.

Par rapport à une oxydation douce uniquement (*O35c0.01*), le COD et le contenu en protéines dissoutes augmentent considérablement alors que la viscosité diminue davantage. Ces trois variations, observées avec les traitements *Al35pH10*, *Tha35t140* et *Tho35c0.01*, sont trois effecteurs qui accroissent communément le rendement de Btk HD-1 dans les BEM (et les BES). Après l'application des deux traitements sur les BEM, il y a davantage d'éléments inorganiques solubles (à l'exception du Cu) que dans les boues ayant subies seulement une oxydation douce. Ces éléments (Fe, Mn, Zn, Ca, P, Na, S, K et Mg) peuvent avoir contribué à la production de métabolites insecticides en grande quantité et/ou plus performants.

Les valeurs de plusieurs paramètres mesurés sur les BEM hydrolysées à température élevée et pH alcalin (*Tha35t140*) augmentent ou diminuent suite à l'application d'une oxydation douce (*Tho35c0.01*). Le COD augmente, la viscosité diminue davantage et plus de protéines sont solubilisées. De plus, les teneurs en Mn, Zn, Ca, Mg, K et S augmentent dans la phase soluble alors que le Cu diminue. Malgré ces variations dont la majorité est bénéfique pour Btk HD-1, les rendements de l'hydrolyse thermo-alcaline et du traitement thermo-oxydant sont similaires ($19,1 \times 10^3$ UI/ μ l pour *Al35pH10* et $19,0 \times 10^3$ UI/ μ l pour *Tha35t140*). Cela suggère que les effets de l'hydrolyse thermo-alcaline sur les BEM soient suffisamment favorables pour atteindre de bons rendements. L'application d'un traitement oxydant ne semble pas nécessaire pour accroître davantage les rendements. Cela suggère aussi que les composés réfractaires produits durant l'hydrolyse thermo-alcaline à 140°C, et susceptibles aux réactions d'oxydation, influencent peu la sporulation et la production de métabolites secondaires insecticides.

5.3.6.2 Fermentation des boues secondaires hydrolysées et oxydées partiellement

L'hydrolyse des BES suivie d'une oxydation douce (0,01 ml H₂O₂/g MES) permet d'accroître les rendements de Btk HD-1. Une très forte production de spores accompagne une entomotoxicité élevée lorsque les boues contiennent 35 g MES/l. L'étape de l'hydrolyse est nécessaire pour augmenter l'entomotoxicité de Bt qui croît dans des BES partiellement oxydées. Par rapport au traitement oxydant *O35c0.01*, le traitement thermo-oxydant *Tho35c0.01* augmente le COD sans nécessairement améliorer le contenu en protéines dissoutes. Ces deux caractéristiques contribuent peut-être à l'augmentation de l'entomotoxicité par rapport à un traitement oxydant seul.

De plus, une quantité très abondante de Cu est dissoute et les BES contiennent plus de Na en phase soluble. Le Zn et le S inorganique dissous sont deux autres éléments traces des BES qui augmentent suite au traitement *Tho35c0.01*. Il est possible que ces ions aient joué un rôle dans

l'entomotoxicité et la sporulation (91% des cellules ayant sporulées dans l'expérience *Tho35c0.01*). Finalement, le traitement *Tho35c0.01* provoque une perte importante en C_t comme le traitement oxydant *O35c0.01*. Comme la perte en N_t est aussi importante, l'impact sur le ratio C:N est minime.

En comparant avec l'application d'une hydrolyse thermo-alcaline seule (*Tha35t140*), l'ajout d'un traitement oxydant permet d'accroître davantage le rendement de Btk HD-1 dans les BES. Le COD diminue légèrement, une plus grande quantité d'azote est volatilisée et la solubilisation des protéines est plus faible (les protéines dissoutes peuvent avoir été dégradées par le traitement oxydant). Ces conditions de culture différentes sont favorables à la production de spores et à l'entomotoxicité de Btk HD-1. En ce qui concerne les éléments inorganiques, le milieu contient moins de Al et P inorganique en phase soluble alors que de plus fortes concentrations en Mn, Cu, Ca, S et Mg sont observées. Ces éléments jouent possiblement un rôle dans les bons résultats en favorisant les processus de sporulation et de production des métabolites secondaires insecticides. Cela est particulièrement le cas pour le Cu dont la concentration atteint environ 4 mg/l. Les bons rendements en spores et entomotoxicité indiquent aussi que Btk HD-1 tolère dans les BES des concentrations en Cu de cet ordre.

5.3.7 Effets de la stérilisation sur les caractéristiques des boues

Les effets des traitements présentés dans ce travail incluent les effets de la stérilisation des boues. Les résultats ne permettent pas de distinguer les effets de la stérilisation de ceux associés aux traitements. Comme les boues d'épuration ne sont pas un milieu de culture conventionnel, les effets de la stérilisation sur les boues ne sont pas documentés. Ce travail fournit néanmoins quelques informations à ce sujet. Le Tableau 9 présente une comparaison entre des analyses réalisées sur des boues brutes et des boues stérilisées. Seuls les paramètres C_t , N_t , ratio C/N et $N-NH_4^+$ peuvent être comparés. Les teneurs en éléments dissous tels que le COD et les métaux ne peuvent pas être comparées car elles n'ont pas été analysées sur les boues brutes.

Tableau 9 Comparaison de quelques caractéristiques des boues brutes et stérilisées.

Caractéristiques	BEM		BES	
	Brutes ¹	Stérilisées ²	Brutes ¹	Stérilisées ²
C _t (mg/kg)	38,3x10 ⁴	38,1x10 ⁴	37,8x10 ⁴	32,6x10 ⁴
N _t (mg N/kg)	26,3x10 ³	25,2x10 ³	66,9x10 ³	53,2x10 ³
Ratio C/N	14,5	15,1	5,61	6,13
N-NH ₄ ⁺ (mg N/kg)	8,4x10 ³	3,8x10 ³	6,4x10 ³	7,3x10 ³

¹ Correspondent aux boues brutes BEM3 et BES3 (voir l'Annexe 6).

² Correspondent aux contrôles *Cont35* des essais préliminaires.

Sur les BEM, la stérilisation a très peu d'influence sur le C_t et le N_t, mais elle diminue le contenu en N-NH₄⁺ (-54% par rapport aux boues brutes). Sur les BES, la stérilisation diminue légèrement le C_t (-14%) et le N_t (-21%), mais l'impact sur le ratio C/N est moindre (+0,5 unité). Elle augmente cependant la teneur de N-NH₄⁺ (+15%).

Ces résultats indiquent que l'effet de la stérilisation sur les caractéristiques des boues doit être considéré dans ce travail. Pour mieux cerner les effets de la stérilisation, il serait souhaitable de répéter les analyses sans appliquer de stérilisation. Il serait aussi intéressant d'explorer davantage les effets de la stérilisation en analysant les protéines dissoutes, le COD et les éléments inorganiques traces.

5.3.8 Caractéristiques communes des meilleurs traitements

5.3.8.1 Diminution de la viscosité

Tous les traitements diminuent la viscosité de 12,6% à 75,5% par rapport au contrôle (*Cont35*). Une faible viscosité améliore le taux de transfert de l'oxygène du milieu aux cellules et le transfert des éléments nutritifs à travers la membrane bactérienne. Cela est favorable pour la sporulation et la production de métabolites secondaires chez Btk HD-1. Les résultats indiquent qu'une baisse de la viscosité permet à Btk HD-1 de croître dans les BEM et les BES contenant plus de 25 g MES/l et d'obtenir de bons rendements à plusieurs occasions. Cependant, certains traitements ne permettent pas à Btk HD-1 de performer à sa pleine capacité (ex. : *Ac35pH2*, *Th35t140*, *O35c0.01*) en raison des effets variables des constituants nouveaux, modifiés, en excès ou manquants dans les boues traitées qui peuvent contrer les effets positifs d'une baisse de la viscosité. Par exemple, la carence de protéines dissoutes dans les BEM après une hydrolyse acide (*Ac35pH2*) maintient une production normale de spores (aucune différence par rapport au contrôle) et augmente légèrement l'entomotoxicité (+23%).

5.3.8.2 Solubilisation partielle des protéines, du carbone organique et des éléments traces inorganiques

Les meilleurs traitements (alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant) augmentent simultanément le COD et les protéines dissoutes dans les BEM et les BES. Comme il a été mentionné précédemment, ces deux paramètres fournissent des sources de carbone et d'azote pour la croissance cellulaire, le processus de sporulation et la production de métabolites insecticides. Ces traitements augmentent aussi les teneurs en Fe, Mo, Zn et Na. Selon la littérature, les éléments Fe, Mo et Zn peuvent affecter la production de métabolites secondaires chez Bt (Sikdar et al., 1991 ; İçgen et al., 2002a ; Ozkan et al., 2003). Comme des bons rendements en entomotoxicité ont été obtenus, cela suggère que Btk HD-1 tolère des concentrations en Fe, Mo et Zn de l'ordre de 45,7 mg/l, 0,2 mg/l et 0,85 mg/l respectivement dans des boues partiellement solubilisées⁸⁵. Finalement, tel que mentionné dans les sections précédentes, les ions Na⁺ contribuent certainement à la solubilisation des protéines et favorisent leur assimilation par les cellules bactériennes. Combinés à des augmentations en COD et protéines dissoutes, les ions Na⁺ permettent à Btk HD-1 d'accroître le nombre de spores et de métabolites secondaires insecticides produits.

5.3.8.3 Effets spécifiques au type de boue

D'autres effets communs aux traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant ont été observés et sont spécifiques au type de boue sur lequel ils sont appliqués :

- Ils dégradent une grande quantité de protéines contenues dans la matière organique prédominante des BEM. Ils augmentent aussi leur concentration en Al dans la phase soluble. L'effet des ions Al³⁺ sur le rendement de Btk HD-1 n'a pas jamais fait l'objet d'études dans la littérature. Il est impossible pour l'instant de savoir s'ils ont contribué aux bons rendements ;
- Ils augmentent le pourcentage de MVES dégradées après 5 jours dans les BES. Cette augmentation suggère que les BES soient plus aptes à la dégradation par voie biologique. Btk HD-1 est donc en mesure de transformer et d'assimiler plus de molécules dans les BES afin d'augmenter les quantités de spores et de métabolites secondaires insecticides produits. Ils augmentent aussi les concentrations en Mn, Cu et S inorganique dans la phase soluble des BES

⁸⁵ Valeurs correspondant aux valeurs maximales observées dans les BES après les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant. Ces valeurs sont aussi plus élevées que celles observées dans les BEM ayant subies les mêmes traitements (voir Figure 13).

qui favorisent la production de métabolites insecticides lorsque leur concentration dans le milieu est adéquate.

5.3.9 Récapitulation sur les expériences préliminaires et les effets des traitements sur les boues

Les résultats préliminaires indiquent que certains traitements transforment les BEM et les BES en un milieu de culture favorable à la production de Btk HD-1. Le potentiel nutritif des boues se manifeste suite à un traitement des boues. Cela signifie qu'il est juste d'ajouter une étape de traitement des boues pour améliorer la performance de ce type de culture microbienne.

L'application des traitements thermo-alkalin et thermo-oxydant sur les BEM et les BES donnent d'excellents rendements en termes d'entomotoxicité et de spores produites. Quant à elle, l'hydrolyse alcaline est un très bon traitement pour les BES seulement. Ces trois traitements ont été sélectionnés pour les travaux d'optimisation présentés au chapitre 6.

Les augmentations d'entomotoxicité de Btk HD-1 dans les boues traitées indiquent qu'il est souhaitable de modifier les boues contenant plus de 35 g MES/l pour en faciliter la fermentation. Par rapport aux boues non traitées, des augmentations d'entomotoxicité de 21% à 141% et du nombre de spores produites de 76% à 269% ont été observées. Ces augmentations sont principalement attribuées à la solubilisation du carbone organique et des protéines, provenant de la matière organique des BEM et des débris cellulaires contenus dans les BES. La diminution de la viscosité et la présence de fortes teneurs en Na dans la phase soluble sont deux autres facteurs dont les effets bénéfiques se cumulent à ceux du COD et des protéines dissoutes.

En ce qui concerne la viscosité des boues, tous les traitements la diminuent à différents degrés. La baisse de la viscosité peut accroître le rendement de Btk HD-1 dans des boues concentrées en améliorant le transfert de l'oxygène et des éléments nutritifs du milieu aux cellules. Toutefois, une faible viscosité améliore le rendement seulement si les constituants nouveaux ou modifiés du milieu sont également favorables à la production de spores et de métabolites insecticides. Néanmoins, la baisse de la viscosité est un avantage intéressant des traitements dans le cadre du procédé BT-INRS car elle peut éventuellement faciliter la manipulation de l'insecticide pour la formulation et la pulvérisation (Brar, 2004 ; Smirnoff, 1980).

Selon les résultats, aucun manque ou excès d'éléments inorganiques en phase soluble (Al, Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, Ca, P, Na, S, K et Mg) ne semble directement perturber la production de spores et de

métabolites insecticides dans les boues traitées. Comme il est mentionné dans la littérature, les processus de sporulation et de production de métabolites secondaires sont influencés par la balance des ions dans le milieu de culture. Les teneurs des éléments traces dans les boues partiellement solubilisées varient selon le type de boue et la technique de traitement utilisée. Il est difficile d'attribuer les bons et les faibles rendements de Btk HD-1 aux variations observées dans les teneurs des éléments traces. Des expériences dans lesquelles la concentrations des ions est contrôlée sont plus appropriées pour comprendre l'effet des éléments traces sur le rendement de Bt. Les résultats de ce travail suggèrent néanmoins que les ions Na^+ favorisent la production de spores et l'entomotoxicité de Btk HD-1. Les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant des BEM et BES dans lesquels de plus grandes teneurs en Na dissous sont observées donnent d'excellents résultats. Très peu d'explications sont disponibles dans la littérature pour expliquer les effets positifs du Na sur l'entomotoxicité de Bt. Des auteurs ont mentionné que le Na pouvait contribuer à la solubilité des protéines (Morris et al., 1996 ; Zaouri et Jaoua, 1999b). Toutefois, le Na est connu pour aider au transport de polymères à travers la membrane bactérienne via des pompes à Na. Ce type de transport membranaire est peu étudié chez les cellules procaryotes. Hase et al. (2001) répertorient des études sur ce sujet. Ils font mention de l'existence de pompes à Na chez *B. subtilis*, l'espèce bactérienne de référence du genre *Bacillus* (Sneath, 1984). Cela suggère que les autres espèces du genre *Bacillus* comme Bt pourraient être équipées de pompe à Na. Si c'est le cas avec Bt, ces pompes fonctionneraient à pleine capacité dans les boues hydrolysées en raison des fortes teneurs en Na et favoriseraient ainsi la formation de spores et autres facteurs de virulence.

Ainsi, un traitement physico-chimique des BEM et des BES parvenant à augmenter simultanément le carbone organique et les protéines en phase soluble, et à diminuer la viscosité, crée d'excellentes conditions de culture pour augmenter le nombre de spore et l'entomotoxicité de Btk HD-1. L'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse thermo-alcaline et le traitement thermo-oxydant sont trois techniques qui provoquent de tels changements. Ils font d'ailleurs l'objet de travaux d'optimisation (chapitre 6).

Des observations intéressantes ont néanmoins été faites sur les autres traitements qui ne font pas l'objet des travaux d'optimisation :

- Hydrolyse acide : Elle ne crée pas de bonnes conditions de culture pour augmenter le rendement de Btk HD-1 dans les BEM. En dépit de son bon pouvoir de solubilisation (COD, Ca, Mg, Mn, P inorganique, etc.), ce type d'hydrolyse ne solubilise pas les protéines des BEM dont Btk HD-1

pourrait s'accaparer. Toutefois, appliquée sur les BES, les constituants nouveaux et modifiés à pH acide favorisent la production de spores et l'entomotoxicité de Btk HD-1 ;

- Hydrolyse thermique : Les modifications apportées au milieu de culture favorisent la production de spores, mais affectent dans plusieurs cas l'entomotoxicité de Btk HD-1. La détérioration du milieu et la formation potentielle de composés réfractaires après une hydrolyse thermique suivie d'une stérilisation sont peut-être responsables des faibles rendements en entomotoxicité. L'hydrolyse thermique agit différemment sur chaque type de boue. La faible diminution de la viscosité des BEM et leurs concentrations inchangées en carbone organique et en Na dans la phase soluble ont possiblement contribué aux baisses d'entomotoxicité. La diminution du COD des BES a peut-être limité la production des métabolites insecticides de Btk HD-1 ;
- Traitement oxydant : Il transforme les BEM et les BES en un milieu de culture favorable pour la production de spores et permet à Btk HD-1 d'accroître son entomotoxicité. Cependant, le traitement oxydant réduit le COD et les protéines dissoutes des BEM. De plus, il n'influence pas le COD des BES et dissout moins de protéines que les traitements alcalin, thermo-alcalin et thermo-oxydant. Par conséquent, le rendement de Btk HD-1 est limité dans les boues partiellement oxydées et n'atteint pas des valeurs aussi élevées que dans les boues hydrolysées. Si le H_2O_2 est utilisé en excès (plus de 0,05 ml/g MES), Btk HD-1 est incapable de croître dans la boue en raison de la présence potentielle de sous-produits d'oxydation susceptibles d'inhiber la croissance de la bactérie.

Les expériences préliminaires ne donnent qu'un aperçu du potentiel des traitements à augmenter le rendement du procédé BT-INRS. La durée, la température et d'autres valeurs de pH sont d'autres facteurs qui influencent ces traitements et par conséquent le rendement de Btk HD-1. En couvrant un intervalle plus large, il est possible de discerner les valeurs de certains paramètres qui permettent d'obtenir les plus fortes entomotoxicités et productions de spores. C'est pourquoi des expériences d'optimisation ont été entreprises avec les meilleurs traitements. Les travaux d'optimisation sont présentés dans le chapitre suivant.



CHAPITRE 6: OPTIMISATION DES TRAITEMENTS DES BOUES POUR LA PRODUCTION DE *B. THURINGIENSIS* HD-1

Ce chapitre présente les travaux d'optimisation des traitements sélectionnés. Les méthodes statistiques utilisées sont d'abord décrites. Ensuite, la planification expérimentale est présentée et les résultats des travaux d'optimisation sont énumérés et discutés. Des expériences de validation en fioles Erlenmeyer et des essais en fermenteur de 15 litres sont finalement présentées et discutées.

6.1 Méthodes statistiques

Le premier objectif de ce travail vise à optimiser les traitements sélectionnés lors des expériences préliminaires présentées au chapitre 5. Les paramètres des traitements sélectionnés correspondent dans ce chapitre aux « valeurs optimales provisoires » nécessaires pour entamer les travaux d'optimisation.

Pour chaque traitement à optimiser en fioles Erlenmeyer, quatre paramètres ont été pris en compte. Les intervalles de valeurs à tester pour chaque paramètre doivent être bien déterminés afin que la région expérimentale contienne les valeurs optimales recherchées. Si l'optimisation était réalisée de façon empirique où un seul paramètre varie dans chacun des essais, le nombre d'expériences à réaliser pour explorer l'étendu des intervalles serait considérable. De plus, l'optimisation par des méthodes empiriques exige normalement plusieurs réplifications de chaque expérience. Comme une expérience en fiole équivaut à un échantillon pour les laborieux bio-essais (représentant 60 tubes à préparer et des dizaines de larves à élever), la charge de travail demandée ne permettait pas de terminer le présent projet dans des délais raisonnables. C'est pourquoi une méthode expérimentale statistique a été proposée pour réduire le nombre d'expériences en fioles Erlenmeyer. Les méthodes expérimentales statistiques permettent également d'identifier et de quantifier les interactions potentielles entre les paramètres. Les valeurs optimales des paramètres de chacun des traitements ont donc été déterminées par la méthode du plan composite centré (PCC) de Box-Wilson et la méthodologie de réponse en surface (MRS), soit deux méthodes expérimentales statistiques appropriées pour l'optimisation des procédés biologiques.

6.1.1 Plan composite centré

Le PCC est une méthode expérimentale statistique couramment utilisée pour optimiser les procédés alimentaires, chimiques et biologiques (Box et Wilson, 1951 ; Ismail et al., 1999). Les auteurs qui travaillent sur la production de produits microbiens du genre *Bacillus* ont souvent recours au PCC pour l'optimisation. Généralement, leurs travaux visent l'optimisation de la composition du milieu de culture pour accroître le rendement en termes de produits microbiens ou d'activité enzymatique⁸⁶.

Le PCC est une planification expérimentale factorielle qui contient trois types de points dans un espace dont les bornes sont déterminées par le nombre de variables expérimentales « k » à analyser. Les trois types de points sont les suivants : les points aux extrémités, les points dits « étoiles » et les points du centre. La Figure 16 illustre l'espace délimité par 2 et 3 variables expérimentales indépendantes. Les variables indépendantes sont des paramètres expérimentaux susceptibles d'influencer la réponse des variables dépendantes. Les variables dépendantes sont les paramètres expérimentaux mesurés lors des expériences d'optimisation.

⁸⁶ Les travaux d'optimisation suivants ont été réalisés à l'aide d'un PCC : production de protéases alcalines par *B. mojavensis* (Beg et al., 2003) ou *Bacillus PE-11* (Adinarayana et Ellaiah, 2002) ; composition du milieu de culture dans lequel *B. circulans* produit des xylanases (Bocchini et al., 2002) ; composition du milieu de culture employé pour la production d'élastase par *Bacillus sp. EL31410* (Chen et al., 2002) ; production de glutamate par *B. licheniformis* (Shih et al., 2002) ; exemple d'application sur la mise à l'échelle des fermentations, spécialement la production de β -exotoxine par Bt (Hsu et Wu, 2002) ; procédé de fermentation de *B. thuringiensis H-14* (Abdel-Hameed, 2001) ; composition du milieu de culture semi-synthétique pour la production de spores de *B. thuringiensis YMB 96-1988* (Lui et Tzeng, 1998) ; composition du milieu de culture pour la production de δ -endotoxines et de spores de Btk (Farrera et al., 1998), ou pour la production de spores uniquement (Xiong et al., 1998).

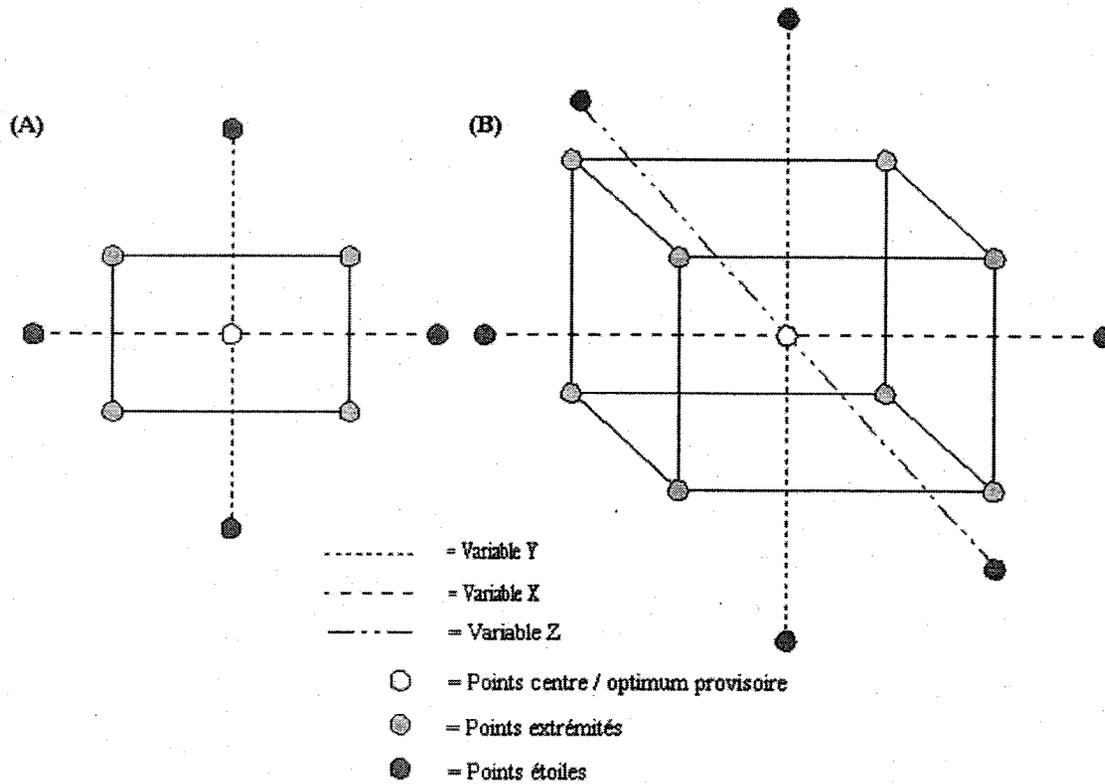


Figure 16 Illustration d'un plan composite centré : (A) PCC avec 2 variables indépendantes ; (B) PCC avec 3 variables indépendantes.

Chacun des points du PCC consiste en une expérience, à l'exception du point central où il peut y avoir des répliques. Le Tableau 10 présente le nombre de points dans un PCC qui dépend du nombre de variables indépendantes (Box et al., 1978).

Tableau 10 Composantes du plan composite centré.

Nombre de variables indépendantes (k)	Nombre de points			Total	Valeur de α^{*2}
	Extrémités (2^k)	Étoile	Centre		
2	4	4	5	13	1,414
3	8	6	6	20	1,682
4	16	8	7	31	2,000
5	32	10	6	48	2,000
6	32 ^{*1}	12	9	53	2,378

*¹ Normalement, il y a 64 combinaisons pour 6 variables, mais seulement une fraction (1/2) peut être réalisée selon la théorie du plan composite centré.

*² Ce travail utilise un plan composite centré rotatif. Pour ce type de PCC, la formule de la distance axiale α est la suivante : $\alpha = (2^k)^{1/4}$.

Les points du centre sont localisés à l'endroit où les conditions optimales recherchées devraient se situer. Ils servent à déterminer la précision des expériences. Ils fournissent également des degrés de liberté additionnels pour l'estimation des erreurs, ce qui donne plus de force pour juger si les effets

des variables sont significatifs (Burket et al., 2004). Les valeurs au point du centre correspondent aux valeurs optimales provisoires. Les points aux extrémités délimitent l'espace dans lequel la présence des conditions optimales recherchées est soupçonnée. Leur distance des valeurs optimales provisoires est décidée par l'expérimentateur. Les points étoiles se situent à l'extérieur des limites et servent à raffiner l'orientation vers les conditions optimales recherchées. Leur distance par rapport aux valeurs optimales provisoires correspond à celle des points aux extrémités multipliée par la **distance axiale** α . La valeur de α dépend du nombre de variables indépendantes à analyser (Tableau 10).

Le PCC a comme principal avantage la faculté de réduire le nombre de répliques à réaliser. La réplique des expériences au point du centre est suffisante pour estimer l'erreur expérimentale et assurer la reproductibilité des résultats. Il n'est pas nécessaire de répliquer les expériences aux autres points qui couvrent une vaste gamme de valeurs. Cela réduit considérablement le nombre d'expériences à effectuer. Cette méthode considère également les effets des interactions potentielles des variables indépendantes sur la réponse de la variable dépendante.

Les résultats obtenus par PCC sont normalement transposés dans un modèle polynomial de premier ou de second ordre pour identifier et quantifier les effets des variables indépendantes sur la réponse de la variable dépendante. Cela permet entre autres de prédire la réponse de la variable dépendante selon les valeurs attribuées aux variables indépendantes. Plusieurs scientifiques utilisent la méthodologie de réponse en surface pour faire cette transposition et déterminer les valeurs optimales des variables (voir section 6.1.3). Ce modèle est aussi analysé avec diverses méthodes statistiques pour vérifier s'il convient pour prédire adéquatement la réponse de la variable dépendante et si les effets des variables indépendantes et leurs interactions sont statistiquement significatifs.

Pour préparer un PCC, il faut d'abord déterminer les valeurs optimales provisoires de chaque traitement. Ces valeurs occupent le point central du PCC. Dans ce travail, les valeurs des paramètres des traitements sélectionnés pour l'optimisation (chapitre 5) correspondent aux valeurs optimales provisoires.

6.1.2 Planification expérimentale

Suite aux expériences préliminaires sur le traitement des boues, les traitements alcalin, thermique et thermo-oxydant des BEM et BES ont été retenus (chapitre 5).

Les travaux d'optimisation réalisées en fioles Erlenmeyer ont été identifiées de cette façon :

- Les deux premières lettres correspondent au traitement, soit « **AL** » pour alcalin, « **TA** » pour thermo-alcalin et « **TO** » pour thermo-oxydant ;
- La 3^{ième} lettre représente le type de boue utilisé, soit « **M** » pour les boues mixtes et « **S** » pour les boues secondaires ;
- La 4^{ième} lettre identifie la composante du PCC où se situe l'expérience, i.e., « **K** », pour les points aux extrémités, « **E** » pour les points étoiles et « **C** » pour les points du centre⁸⁷.

Les prochaines sous-sections présentent toutes les expériences élaborées avec le PCC. Chaque optimisation d'un traitement est réalisée en totalité avec une boue échantillonnée à une date différente afin d'atténuer les biais associés à la composition potentiellement variable des boues (voir l'Annexe 8).

Chaque traitement comprend des variables indépendantes et des variables dépendantes. Les traitements à l'étude partagent les mêmes variables indépendantes, soit la concentration en MES des boues ainsi que le pH, la température et la durée de l'hydrolyse. Les variables dépendantes sont aussi communes à tous les traitements. Il s'agit des comptes totaux (cellules et spores viables), de la concentration en spores viables et de l'entomotoxicité.

Les intervalles étudiés pour les variables indépendantes ont été déterminés en fonction des expériences préliminaires. Pour les paramètres demeurés constants lors des expériences préliminaires (soit la température et la durée de l'hydrolyse alcaline, la durée et le pH de l'hydrolyse thermo-alcaline ainsi que la température, la durée et le pH de l'hydrolyse thermo-alcaline du traitement thermo-oxydant), les intervalles ont été déterminés selon l'information tirée de la littérature (section 2.2.2.3). Il est souhaitable d'utiliser le plus court intervalle possible pour cerner avec exactitude les valeurs optimales (Box et al., 1978). Cela a été pris en considération dans le choix des intervalles.

⁸⁷ Par exemple, l'expérience ALSE7 consiste en une hydrolyse alcaline des boues secondaires dont les paramètres expérimentaux correspondent à l'expérience située au septième point étoile du PCC.

6.1.2.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires

L'hydrolyse alcaline à pH 10 des BES ajustées à 35 g MES/l a été sélectionnée pour l'optimisation. Le pH, la concentration en MES, la température et la durée de l'hydrolyse ont été identifiés comme les paramètres susceptibles d'influencer le degré de solubilisation et par conséquent le rendement de Btk HD-1 cultivée dans les boues traitées. Ils ont donc été intégrés dans le PCC. Les valeurs de l'optimum provisoire (point du centre) sont indiquées au Tableau 11. Elles ont permis de concevoir le cheminement expérimental présenté dans le Tableau 12.

Tableau 11 Valeurs des variables indépendantes aux différents points du PCC pour optimiser l'hydrolyse alcaline des BES.

Variables indépendantes	Symbole	Points du PCC		
		Centre (C)	Extrémités (K)	Étoiles (E)
MES (g/l)	X ₁	35	± 5	± 10
pH	X ₂	10	± 1	± 2
Température de l'hydrolyse (°C)	X ₃	30	± 2,5	± 5
Durée de l'hydrolyse (h)	X ₄	24	± 4	± 8

Tableau 12 Expériences pour optimiser l'hydrolyse alcaline des BES préparées selon un PCC factoriel (2⁴) avec huit points étoiles. Sept réplifications sont prévues au point du centre. Variables indépendantes : X₁ = MES (g/l) ; X₂ = pH ; X₃ = température (°Celsius) ; X₄ = durée (h).

Code	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
ALSK1	30	9	27,5	20
ALSK2	30	9	27,5	28
ALSK3	30	9	32,5	20
ALSK4	30	9	32,5	28
ALSK5	30	11	27,5	20
ALSK6	30	11	27,5	28
ALSK7	30	11	32,5	20
ALSK8	30	11	32,5	28
ALSK9	40	9	27,5	20
ALSK10	40	9	27,5	28
ALSK11	40	9	32,5	20
ALSK12	40	9	32,5	28
ALSK13	40	11	27,5	20
ALSK14	40	11	27,5	28
ALSK15	40	11	32,5	20
ALSK16	40	11	32,5	28
ALSE1	25	10	30	24
ALSE2	45	10	30	24
ALSE3	35	8	30	24
ALSE4	35	12	30	24
ALSE5	35	10	25	24
ALSE6	35	10	35	24
ALSE7	35	10	30	16
ALSE8	35	10	30	32
ALSC1 - ALSC7	35	10	30	24

6.1.2.2 Hydrolyse thermo-alkaline des boues mixtes et secondaires

L'hydrolyse thermo-alkaline à 140°C et pH 10 des boues ajustées à 35 g MES/l a été sélectionnée pour l'optimisation. Comme pour l'hydrolyse alcaline, le pH, la concentration en MES, la température et la durée de l'hydrolyse ont été identifiés comme des variables susceptibles d'influencer le degré de solubilisation. Ils ont été intégrés dans le PCC dont les valeurs de chaque point sont indiquées au Tableau 13. Le Tableau 14 présente le cheminement expérimental pour optimiser l'hydrolyse thermo-alkaline.

Tableau 13 Valeurs des variables indépendantes aux différents points du PCC pour optimiser l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM et des BES.

Variables indépendantes	Symbole	Points du PCC		
		Centre (C)	Extrémités (K)	Étoiles (E)
MES (g/l)	X ₁	35	± 5	± 10
pH	X ₂	10	± 1	± 2
Température de l'hydrolyse (°C)	X ₃	140	± 10	± 20
Durée de l'hydrolyse (min)	X ₄	30	± 10	± 20

Tableau 14 Expériences pour optimiser l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM et des BES préparées selon un PCC factoriel (2⁴) avec huit points étoiles. Sept réplifications sont prévues au point du centre. Variables indépendantes : X₁ = MES (g/l) ; X₂ = pH ; X₃ = température (°Celsius); X₄ = durée (min).

Code	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
TASK1 / TAMK1	30	9	130	20
TASK2 / TAMK2	30	9	150	20
TASK3 / TAMK3	30	11	130	20
TASK4 / TAMK4	30	11	150	20
TASK5 / TAMK5	30	9	130	40
TASK6 / TAMK6	30	9	150	40
TASK7 / TAMK7	30	11	130	40
TASK8 / TAMK8	30	11	150	40
TASK9 / TAMK9	40	9	130	20
TASK10 / TAMK10	40	9	150	20
TASK11 / TAMK11	40	11	130	20
TASK12 / TAMK12	40	11	150	20
TASK13 / TAMK13	40	9	130	40
TASK14 / TAMK14	40	9	150	40
TASK15 / TAMK15	40	11	130	40
TASK16 / TAMK16	40	11	150	40
TASE1 / TAME1	25	10	140	30
TASE2 / TAME2	45	10	140	30
TASE3 / TAME3	35	8	140	30
TASE4 / TAME4	35	12	140	30
TASE5 / TAME5	35	10	120	30
TASE6 / TAME6	35	10	160	30
TASE7 / TAME7	35	10	140	10
TASE8 / TAME8	35	10	140	50
TASCI – TASC7 / TAMC1 – TAMC7	35	10	140	30

6.1.2.3 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes et secondaires

Le traitement thermo-oxydant des boues ajustées à 35 g MES/l a été sélectionné pour l'optimisation. Seule la partie thermo-alkaline de ce traitement fait l'objet de l'optimisation. Les variables indépendantes et le cheminement expérimental sont identiques à l'hydrolyse alcaline des boues mixtes et secondaires (voir la sous-section précédente). Les codes des expériences du PCC pour le traitement thermo-oxydant sont : « TOMC/TOSC » pour les points du centre ; « TOMK/TOSK » pour les points aux extrémités ; « TOME/TOSE » pour les points étoilés.

6.1.3 Méthodologie de réponse en surface

Dans ce travail, l'analyse des résultats obtenus avec le PCC est réalisée par la méthodologie de réponse en surface (MRS) avec le logiciel STATISTICA (version 6,0) de Statsoft Inc. (Tulsa, États-Unis).

La MRS a été développée par Box et Wilson (1951) et plusieurs auteurs l'ont utilisée pour optimiser les procédés alimentaires, chimiques et biologiques à partir de résultats obtenus par des méthodes expérimentales statistiques, particulièrement le PCC (Farrera et al., 1998 ; Liu et Tzeng, 1998 ; Xiong et al., 1998 ; Kennedy et Krouse, 1999 ; Bocchini et al., 2002 ; Chen et al., 2002 ; Hsu et Wu, 2002). Il s'agit d'une procédure séquentielle dont l'objectif initial est d'orienter rapidement et efficacement l'expérimentateur vers les valeurs optimales par des améliorations succinctes. Cette méthode d'optimisation génère des profils en deux dimensions et des surfaces tridimensionnelles à partir des **effets linéaires, quadratiques et interactifs** de deux ou plusieurs variables indépendantes sur une variable dépendante. Elle y intègre ensuite les données expérimentales pour calculer la réponse optimale du système (Dey et al., 2001 ; Shih et al., 2002). Elle identifie les valeurs optimales des variables indépendantes en évaluant la pente la plus abrupte et en explorant les abords du sommet de la pente. Pour deux variables, la surface est visualisée sur une carte topographique dans laquelle le niveau du rendement correspond la hauteur du quadrillage formé par les variables. La surface peut aussi être illustrée en trois dimensions où la pointe de la surface quadrillée correspond aux valeurs optimales des variables. Si le modèle a plus de deux variables, la surface est illustrée en trois dimensions avec deux variables alors que les autres ont une valeur fixe. Le principal avantage de la MRS est qu'elle permet d'évaluer la signification statistique de plusieurs facteurs lorsqu'ils sont soumis à des interactions complexes. De plus, elle est fréquemment utilisée pour étudier et optimiser la production de Bt à partir d'un PCC (Abdel-Hameed, 1998 ; Farrera et al., 1998 ; Liu et Tzeng, 1998 ; Xiong et al., 1998 ; Hsu et Wu, 2002).

C'est pour ces deux raisons que la MRS a été choisie dans ce travail pour interpréter les résultats du PCC.

L'identification des valeurs optimales par la MRS via le logiciel STATISTICA se déroule en plusieurs étapes (Statsoft, 2004). En premier lieu, le logiciel transpose les effets des variables indépendantes et de leurs interactions sur la réponse de la variable dépendante dans un modèle polynomial de second ordre. Le modèle contient les composantes linéaires des variables indépendantes sur une variable dépendante ainsi que les effets interactifs entre chaque variable indépendante (deux à la fois). De plus, des composants quadratiques y sont intégrés afin d'explorer de façon plus approfondie la sous-région de la réponse en surface. Le degré d'importance de chaque variable indépendante sur la réponse de la variable dépendante est évalué par une **estimation des effets**. Une **analyse de régression** est également appliquée pour déterminer les **coefficients de régression** (β) de chaque composante. Les coefficients de régression indiquent si les composantes ont une influence positive ou négative sur la réponse de la variable dépendante. Ils sont alors fixés dans une équation de régression permettant de prédire la réponse de la variable dépendante. La signifiante statistique des effets et des coefficients de régression est évaluée par un **test de Student** (t) et les valeurs de **probabilité** (p) associées. Dans ce travail, le modèle de régression associé à chaque traitement répond à une équation de second degré (Équation 6).

$$\text{Équation 6} \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum_{i=1} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j$$

Où Y = Réponse prédite de la variable dépendante (comptes totaux, spores viables, entomotoxicité)

X_i et X_j = Variables indépendantes influençant la réponse de Y

β_0 = Constante de l'équation de second degré

β_i = Coefficient de régression linéaire de chaque variable indépendante

β_{ii} = Coefficient de régression quadratique de chaque variable indépendante

β_{ij} = Coefficients de régression des interactions entre deux variables indépendantes

En second lieu, la MRS détermine la forme et l'orientation de la réponse en surface en calculant les **valeurs propres** et les **vecteurs propres** des effets quadratiques. Ces deux éléments permettent d'identifier le point de la réponse en surface qui définit la courbure de la surface. Ce point correspond aux valeurs optimales locales recherchées.

Les sources de variabilité des modèles mathématiques sont évaluées par une **analyse de variance** (ANOVA). L'ANOVA calcule la **somme des écarts** (SE) et la **moyenne des écarts** (ME) de chaque composante du modèle. Les SE et ME sont utilisées pour mesurer trois sources de variabilité (modèle de régression, résiduelle et totale) qui permettent de calculer le **coefficient de détermination** (R^2) et d'évaluer le **manque d'ajustement** ainsi que l'**erreur pure**. Le R^2 donne

un indice de la précision du modèle. Le manque d'ajustement indique si le modèle est adéquat pour prédire la réponse de la variable dépendante alors que l'erreur pure informe sur la reproductibilité des résultats. Finalement, l'ANOVA détermine la signifiante du modèle mathématique et du manque d'ajustement par un **test de Fisher (F)** et les valeurs p associées.

6.2 Résultats en fioles Erlenmeyer

Cette section est restreinte aux résultats d'optimisation des traitements vis-à-vis l'entomotoxicité. L'entomotoxicité est la principale variable dépendante pour évaluer la performance du procédé BT-INRS. Les travaux d'optimisation visent à optimiser cette variable et c'est pourquoi les résultats sont présentés et interprétés de façon approfondie. En ce qui concerne les comptes totaux et le nombre de spores produites, les résultats d'optimisation ne sont pas présentés, mais ils sont disponibles à l'Annexe 8. Les résultats des contrôles négatifs sont aussi disponibles à l'Annexe 8. Ils indiquent que les boues mixtes et les boues secondaires utilisées dans cette série d'expérience (BEM4, BEM5, BES4, BES5 et BES6) n'ont aucun (ou très peu) d'effet entomotoxique envers les larves de *C. occidentalis*. Les pourcentages de mortalité observés sont inférieurs ou équivalents à ceux du témoin (diète seulement) dans les bioessais.

6.2.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires

Le Tableau 14 présente les **valeurs observées** des entomotoxicités de Btk HD-1 cultivée dans des BES ayant subies préalablement une hydrolyse alcaline. L'entomotoxicité moyenne des sept expériences répliquées aux points du centre est de $(13,6 \pm 1,1) \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$. Cette valeur est inférieure à l'expérience préliminaire *A135pH10* dont l'entomotoxicité était de $18,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$, soit une baisse de 34,6%. Une analyse de la régression avec le logiciel STATISTICA a été réalisée sur les valeurs observées. Un modèle de régression a été conçu par le logiciel afin de prédire l'entomotoxicité en fonction des effets des variables indépendantes. La différence entre les **valeurs prédites** et observées de l'entomotoxicité donne les **valeurs résiduelles**. Les valeurs prédites et résiduelles sont aussi présentées dans le Tableau 15. Une très forte entomotoxicité de $20,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ est obtenue à une concentration élevée en MES (40 g/l), un pH très basique (11) et une température légèrement plus élevée ($32,5^\circ\text{C}$) après une plus courte durée de traitement (20h). Dans ces conditions, le modèle prédit une valeur inférieure, soit $17,9 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$.

Tableau 15 Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse alcaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

PCC	Code	Variables indépendantes				Entomotoxicité (UIx10 ³ /µl)		
		X_1	X_2	X_3	X_4	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle
Points aux extrémités (K)	ALSK1	30	9	27,5	20	10,6	11,6	-1,1
	ALSK2	30	9	27,5	28	12,0	13,1	-1,1
	ALSK3	30	9	32,5	20	10,5	10,2	0,3
	ALSK4	30	9	32,5	28	11,1	11,3	-0,2
	ALSK5	30	11	27,5	20	13,6	12,6	1,0
	ALSK6	30	11	27,5	28	14,2	13,6	0,6
	ALSK7	30	11	32,5	20	16,0	15,3	0,7
	ALSK8	30	11	32,5	28	14,1	16,0	-1,9
	ALSK9	40	9	27,5	20	18,7	15,4	3,2
	ALSK10	40	9	27,5	28	12,5	14,5	-2,0
	ALSK11	40	9	32,5	20	11,2	13,1	-1,9
	ALSK12	40	9	32,5	28	12,2	11,8	0,4
	ALSK13	40	11	27,5	20	15,0	16,1	-1,1
	ALSK14	40	11	27,5	28	15,7	14,7	1,1
	ALSK15	40	11	32,5	20	20,4	17,9	2,5
	ALSK16	40	11	32,5	28	15,9	16,1	-0,2
Points étoiles (E)	ALSE1	25	10	30	24	13,7	12,8	0,9
	ALSE2	45	10	30	24	15,8	16,8	-1,0
	ALSE3	35	8	30	24	12,3	11,1	1,2
	ALSE4	35	12	30	24	15,1	16,4	-1,3
	ALSE5	35	10	25	24	13,2	13,4	-0,3
	ALSE6	35	10	35	24	13,6	13,4	0,2
	ALSE7	35	10	30	16	12,2	14,0	-1,8
	ALSE8	35	10	30	32	15,4	13,7	1,7
Points au centre*	ALSC1	35	10	30	24	15,9	13,6	2,3
	ALSC2	35	10	30	24	12,7	13,6	-0,9
	ALSC3	35	10	30	24	12,7	13,6	-0,9
	ALSC4	35	10	30	24	13,0	13,6	-0,7
	ALSC5	35	10	30	24	13,3	13,6	-0,3
	ALSC6	35	10	30	24	13,7	13,6	0,0
	ALSC7	35	10	30	24	14,2	13,6	0,5

* Moyenne des expériences répliquées aux points du centre : $(13,6 \pm 1,1) \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$.

Le modèle mathématique a été soumis à une analyse de variance (ANOVA) et l'importance des effets a été estimée par le logiciel STATISTICA. Les données sont présentées dans le Tableau 16.

Les coefficients de régression du modèle qui ont été utilisés pour le calcul des valeurs prédites sont aussi inclus dans le Tableau 16.

Tableau 16 Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficients de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse alcaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001$, $0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.

Composantes	Estimation des effets				Coefficient de régression (β)			
	Effet	S	t	p	Valeur	S	t	p
Constante	13645,39	690,57	19,7597	0,0000	64480,97	112265	0,5744	0,5737
X_1	1979,50	745,90	2,6539	0,0173	839,34	1805	0,4650	0,6482
X_1^2	571,23	683,33	0,8359	0,4155	11,42	14	0,8359	0,4155
X_2	2636,75	745,90	3,5350	0,0028	-10285,96	9727	-1,0575	0,3060
X_2^2	43,98	683,33	0,0644	0,9495	21,99	342	0,0644	0,9495
X_3	-15,74	745,90	-0,0211	0,9834	-2744,91	4118	-0,6666	0,5145
X_3^2	-118,92	683,33	-0,1740	0,8640	-9,51	55	-0,1740	0,8640
X_4	-125,81	745,90	-0,1687	0,8682	1438,28	2209	0,6511	0,5242
X_4^2	114,43	683,33	0,1675	0,8691	3,58	21	0,1675	0,8691
$X_1 * X_2$	-157,89	913,53	-0,1728	0,8649	-15,79	91	-0,1728	0,8649
$X_1 * X_3$	-458,75	913,53	-0,5022	0,6224	-18,35	37	-0,5022	0,6224
$X_1 * X_4$	-1221,18	913,53	-1,3368	0,2000	-30,53	23	-1,3368	0,2000
$X_2 * X_3$	2076,56	913,53	2,2731	0,0372	415,31	183	2,2731	0,0372
$X_2 * X_4$	-247,42	913,53	-0,2708	0,7900	-30,93	114	-0,2708	0,7900
$X_3 * X_4$	-165,23	913,53	-0,1809	0,8587	-8,26	46	-0,1809	0,8587

ANOVA, $R^2 = 0,63$					
Source de variabilité	SE	d.l.	ME	F	p
Modèle de régression	92433817	14	6602416	1,9779	0,0959
Résiduelle	53410631	16	3338164		
Manque d'ajustement	45690906	10	4569091	3,5512	0,0672
Erreur pure	7719724	6	1286621		
Totale	145844448	30			

Le coefficient de détermination (R^2) du modèle est 0,63 (Tableau 15). Ce coefficient indique que 63% de la variabilité de la réponse (entomotoxicité) peut être expliquée par le modèle. L'effet linéaire du pH de l'hydrolyse est hautement significative ($p < 0,005$) alors que celui de la concentration en MES (X_1) est statistiquement significative ($p < 0,01$). L'effet de l'interaction entre le pH et la température de l'hydrolyse ($X_2 * X_3$) est marginalement significative ($p < 0,05$). Ces trois effets ont un impact important sur la réponse du modèle.

Les coefficients de régression ont été intégrés dans l'Équation 6. L'équation de régression représentant l'entomotoxicité dans l'espace expérimental étudié est énoncée à l'Équation 7.

Équation 7
$$Y = 64480,97 + 839,34 \cdot X_1 - 10285,96 \cdot X_2 - 2744,91 \cdot X_3 + 1438,28 \cdot X_4 + 11,42 \cdot X_1^2 + 21,99 \cdot X_2^2 - 9,51 \cdot X_3^2 + 3,58 \cdot X_4^2 - 15,79 \cdot X_1 \cdot X_2 - 18,35 \cdot X_1 \cdot X_3 - 30,53 \cdot X_1 \cdot X_4 + 415,31 \cdot X_2 \cdot X_3 - 30,93 \cdot X_2 \cdot X_4 - 8,26 \cdot X_3 \cdot X_4$$

Où Y = entomotoxicité, X_1 = MES, X_2 = pH, X_3 = température, X_4 = durée.

Parmi tous les coefficients de régression, seul celui de l'interaction de la température et du pH ($X_2 \cdot X_3$) est marginalement significatif. Tous les autres coefficients ont un très grand écart type. L'effet de l'interaction de la température et du pH est positif. La Figure 17 illustre la réponse en surface de l'interaction $X_2 \cdot X_3$. Cette surface en forme de selle montre que l'entomotoxicité augmente lorsque le pH augmente et que la température diminue (et vice-versa). Elle indique aussi que l'entomotoxicité diminue si le pH est trop élevée et la température est très basse (et vice-versa).

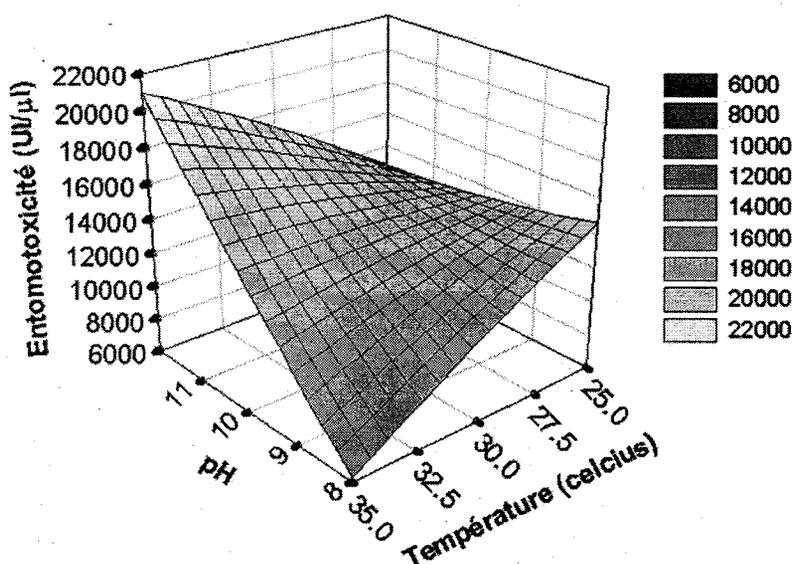


Figure 17 Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction du pH et de la température de l'hydrolyse alcaline des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g MES/l et 24h.

Les valeurs critiques ou optimales des variables indépendantes de l'hydrolyse alcaline sont obtenues à partir de la MRS. Elles sont présentées au Tableau 17. Si Btk HD-1 fermente des BES ayant subies une hydrolyse alcaline aux valeurs optimales des paramètres du traitement, une entomotoxicité de $18,7 \times 10^3$ UI/μl pourrait être atteinte à un intervalle de confiance de +95% et de $20,5 \times 10^3$ UI/μl à un intervalle de prédiction de +95%.

Tableau 17 Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse alcaline des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.

Valeurs critiques				Valeur prédite de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	Valeur maximale de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	
MES (g/l)	pH	Temp. (°C)	Durée (h)		Intervalle de confiance à 95%	Intervalle de prédiction à 95%
37,2	10,2	27,6	33,5	13,9	18,7	20,1

6.2.2 Hydrolyse thermo-alcaline

6.2.2.1 Boues mixtes

Le Tableau 18 présente les valeurs observées, prédites et résiduelles de l'entomotoxicité de Btk HD-1 cultivée dans des BEM ayant subies préalablement une hydrolyse thermo-alcaline. L'entomotoxicité moyenne des répliques aux points du centre est de $(14,7 \pm 0,6) \times 10^3$ UI/μl. Il s'agit d'une baisse d'entomotoxicité de 29,8% par rapport rapport à l'expérience préliminaire *Tha35t140* dont la valeur était de $19,1 \times 10^3$ UI/μl. Lorsque les BES sont très concentrées en MES (45 g/l), une forte entomotoxicité de $16,7 \times 10^3$ UI/μl est obtenue. Aux mêmes conditions, le modèle de régression prédit une valeur de $16,1 \times 10^3$ UI/μl. La plus forte prédiction du modèle ($16,7 \times 10^3$ UI/μl) est faite lorsque l'hydrolyse est réalisée à pH 11 et 130°C pendant 40 min sur des BES contenant 40 g MES/l.

Tableau 18 Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min.) de l'hydrolyse.

PCC	Code	Variables indépendantes				Entomotoxicité (UIx10 ³ /µl)		
		X_1	X_2	X_3	X_4	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle
Points aux extrémités (K)	TAMK1	30	9	130	20	13,5	12,8	0,7
	TAMK2	30	9	150	20	13,8	13,4	0,4
	TAMK3	30	11	130	20	14,2	14,2	-0,1
	TAMK4	30	11	150	20	15,5	15,7	-0,2
	TAMK5	30	9	130	40	11,8	11,9	-0,1
	TAMK6	30	9	150	40	12,4	11,9	0,5
	TAMK7	30	11	130	40	13,5	13,1	0,4
	TAMK8	30	11	150	40	14,1	14,1	0,1
	TAMK9	40	9	130	20	12,8	13,0	-0,2
	TAMK10	40	9	150	20	11,7	11,9	-0,1
	TAMK11	40	11	130	20	13,7	14,0	-0,2
	TAMK12	40	11	150	20	13,8	13,7	0,0
	TAMK13	40	9	130	40	16,4	15,9	0,4
	TAMK14	40	9	150	40	14,3	14,3	0,0
	TAMK15	40	11	130	40	16,2	16,7	-0,5
	TAMK16	40	11	150	40	15,5	16,0	-0,5
Points étoiles (E)	TAME1	25	10	140	30	13,3	14,0	-0,8
	TAME2	45	10	140	30	16,7	16,1	0,6
	TAME3	35	8	140	30	11,0	11,7	-0,7
	TAME4	35	12	140	30	15,4	14,8	0,6
	TAME5	35	10	120	30	14,5	14,6	-0,1
	TAME6	35	10	160	30	14,4	14,4	0,0
	TAME7	35	10	140	10	12,0	12,1	-0,1
	TAME8	35	10	140	50	13,4	13,4	-0,1
Points au centre*	TAMC1	35	10	140	30	14,8	14,7	0,1
	TAMC2	35	10	140	30	14,7	14,7	0,0
	TAMC3	35	10	140	30	15,2	14,7	0,4
	TAMC4	35	10	140	30	13,7	14,7	-1,0
	TAMC5	35	10	140	30	14,1	14,7	-0,6
	TAMC6	35	10	140	30	15,1	14,7	0,3
	TAMC7	35	10	140	30	15,5	14,7	0,8

* Moyenne des réplifications aux points du centre : $(14,7 \pm 0,6) \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$.

Les tests statistiques appliqués sur les données expérimentales sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19

Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficients de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse ; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001$, $0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.

Composantes	Estimation des effets				Coefficient de régression (β)			
	Effet	S	t	p	Valeur	S	t	p
Constante	14723,01	229,90	64,0417	0,0000	-49335,95	40218	-1,2267	0,2377
X_1	1045,03	248,32	4,2084	0,0007	685,70	620	1,1063	0,2849
X_1^2	177,17	227,49	0,7788	0,4475	3,54	4,55	0,7788	0,4475
X_2	1545,06	248,32	6,2221	0,0000	5820,63	3326	1,7499	0,0993
X_2^2	-720,10	227,49	-3,1654	0,0060	-360,05	114	-3,1654	0,0060
X_3	-93,81	248,32	-0,3778	0,7106	269,09	372	0,7241	0,4795
X_3^2	-116,35	227,49	-0,5114	0,6160	-0,58	1,14	-0,5114	0,6160
X_4	656,41	248,32	2,6434	0,0177	-115,73	291	-0,3979	0,6959
X_4^2	-966,17	227,49	-4,2471	0,0006	-4,83	1,14	-4,2471	0,0006
$X_1 * X_2$	-228,30	304,13	-0,7507	0,4638	-22,83	30,4	-0,7507	0,4638
$X_1 * X_3$	-840,09	304,13	-2,7623	0,0139	-8,40	3,04	-2,7623	0,0139
$X_1 * X_4$	1917,26	304,13	6,3042	0,0000	19,17	3,04	6,3042	0,0000
$X_2 * X_3$	443,83	304,13	1,4594	0,1638	22,19	15,2	1,4594	0,1638
$X_2 * X_4$	-103,28	304,13	-0,3396	0,7386	-5,16	15,2	-0,3396	0,7386
$X_3 * X_4$	-258,57	304,13	-0,8502	0,4078	-1,29	1,52	-0,8502	0,4078

ANOVA, $R^2 = 0,90$					
Source de variabilité	SE	d.l.	ME	F	p
Modèle de régression	52617958	14	3758426	10,1588	<0,0001
Résiduelle	5919502	16	369969		
Manque d'ajustement	3595330	10	359533	0,9282	0,5640
Erreur pure	2324172	6	387362		
Totale	58537461	30			

L'analyse ANOVA montre que le modèle de régression a un coefficient de détermination de 0,9 et qu'il est hautement significatif ($p < 0,0001$). Cela signifie que le modèle explique 90% de la variation de la réponse. Les effets linéaires des MES (X_1), du pH (X_2) et de la durée de l'hydrolyse (X_4) sont significatifs. Les effets quadratiques du pH (X_2^2) et de la durée de l'hydrolyse (X_4^2) sont hautement significatifs. Les effets des interactions des MES avec la température ($X_1 * X_3$) et la durée de l'hydrolyse ($X_1 * X_4$) sont significatives. Certains de ces effets significatifs ont très peu d'impact sur le modèle, soit les effets quadratiques du pH (X_2^2) et de la durée (X_4^2) ainsi que l'effet interactif

des MES et de la température ($X_1 \cdot X_3$). Le modèle mathématique capable de prédire l'entomotoxicité dans l'espace expérimental étudié est énoncé à l'Équation 8.

Équation 8
$$Y = -49335,95 + 685,70 \cdot X_1 + 5820,63 \cdot X_2 + 269,09 \cdot X_3 - 115,73 \cdot X_4 + 3,54 \cdot X_1^2 - 360,05 \cdot X_2^2 - 0,58 \cdot X_3^2 - 4,83 \cdot X_4^2 - 22,83 \cdot X_1 \cdot X_2 - 8,40 \cdot X_1 \cdot X_3 + 19,17 \cdot X_1 \cdot X_4 + 22,19 \cdot X_2 \cdot X_3 - 5,16 \cdot X_2 \cdot X_4 - 1,29 \cdot X_3 \cdot X_4$$

Où Y = entomotoxicité, X_1 = MES, X_2 = pH, X_3 = température, X_4 = durée.

Le coefficient quadratique du pH (X_2^2) a un effet négatif qui est statistiquement significatif. Sa valeur p de 0,006 signifie que 99,4% des réponses prédites par le modèle sont affectés par cette variable. Le coefficient quadratique de la durée de l'hydrolyse (X_4^2), ayant un effet négatif, est significatif. Deux interactions sont significatives, soit celles des MES avec la température ($X_1 \cdot X_3$) et la durée de l'hydrolyse ($X_1 \cdot X_4$). L'interaction $X_1 \cdot X_4$ a un effet positif sur le modèle qui est très important selon l'estimation des effets. Elle est illustrée à la Figure 18. Cette figure en forme de selle indique qu'il est souhaitable de prolonger la durée de l'hydrolyse lorsque les BEM sont très concentrées en MES (et vice-versa). Elle indique aussi que la réponse est plus faible si une hydrolyse de courte durée est appliquée sur des boues très concentrées (et vice-versa).

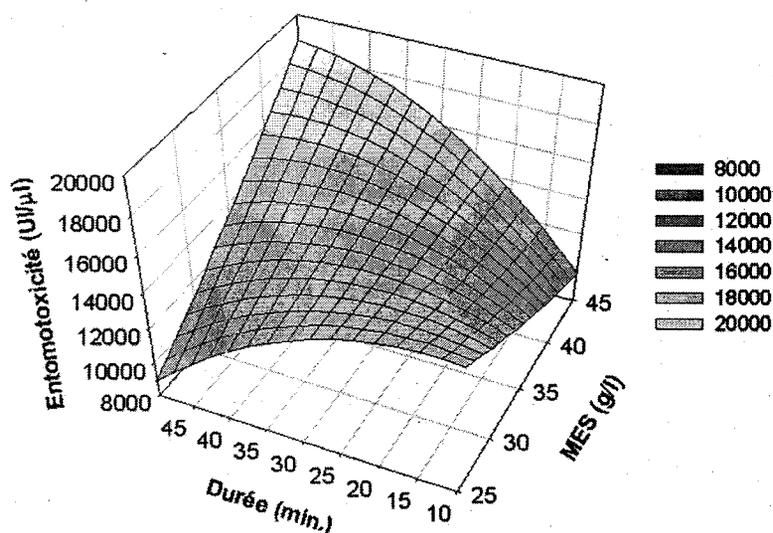


Figure 18 Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM où les valeurs (fixes) du pH et de la température de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 10 et 140°C.

La MRS a identifié à partir du modèle les conditions optimales de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM (Tableau 20). Si les conditions optimales sont appliquées, une entomotoxicité de

16,4x10³UI/μl pourrait être atteinte à un intervalle de confiance de +95% et de 17,0x10³UI/μl à un intervalle de prédiction de +95%.

Tableau 20 Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.

Valeurs critiques				Valeur prédite de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	Valeur maximale de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	
MES (g/l)	pH	Temp. (°C)	Durée (min)		Intervalle de confiance à 95%	Intervalle de prédiction à 95%
35,9	11,5	154,8	32,5	15,4	16,4	17,0

6.2.2.2 Boues secondaires

Le Tableau 21 présente les résultats des expériences d'optimisation de l'hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires. La moyenne des répliques aux points du centre est (11,9±1,3)x10³UI/μl. Cette valeur est du même ordre que celle obtenue lors de l'expérience préliminaire *Tha35t140*, soit 12,6x10³UI/μl. Une forte entomotoxicité est obtenue après l'hydrolyse de BES contenant 30 g MES/l à pH 9 et 150°C pendant 40 min (16,7x10³UI/μl), mais le modèle de régression prédit une valeur inférieure dans les mêmes conditions (14,8x10³UI/μl). Le modèle prédit une forte entomotoxicité de 15,4x10³UI/μl lorsque l'hydrolyse est effectuée à une température de 160°C.

Tableau 21 Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alkaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

PCC	Code	Variables indépendantes				Entomotoxicité (UIx10 ³ /μl)		
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle
Points aux extrémités (K)	TASK1	30	9	130	20	15,1	14,3	0,8
	TASK2	30	9	150	20	13,7	12,9	0,8
	TASK3	30	11	130	20	15,2	13,5	1,7
	TASK4	30	11	150	20	14,4	13,5	0,9
	TASK5	30	9	130	40	14,5	14,4	0,0
	TASK6	30	9	150	40	16,7	14,8	2,0
	TASK7	30	11	130	40	14,2	12,6	1,5
	TASK8	30	11	150	40	14,1	14,3	-0,3
	TASK9	40	9	130	20	16,1	13,2	2,8
	TASK10	40	9	150	20	11,4	11,7	-0,3
	TASK11	40	11	130	20	12,0	12,8	-0,7
	TASK12	40	11	150	20	15,1	12,5	2,5
	TASK13	40	9	130	40	13,7	13,4	0,3
	TASK14	40	9	150	40	14,4	13,5	0,9
	TASK15	40	11	130	40	13,7	11,9	1,8
	TASK16	40	11	150	40	13,8	13,3	0,4
Points étoilés (E)	TASE1	25	10	140	30	13,1	14,9	-1,8
	TASE2	45	10	140	30	10,9	12,9	-2,0
	TASE3	35	8	140	30	10,4	12,1	-1,7
	TASE4	35	12	140	30	9,1	11,2	-2,0
	TASE5	35	10	120	30	13,1	15,3	-2,2
	TASE6	35	10	160	30	13,8	15,4	-1,5
	TASE7	35	10	140	10	9,6	11,9	-2,3
	TASE8	35	10	140	50	11,4	12,8	-1,5
Points au centre*	TASC1	35	10	140	30	14,0	11,9	2,0
	TASC2	35	10	140	30	12,1	11,9	0,2
	TASC3	35	10	140	30	12,3	11,9	0,3
	TASC4	35	10	140	30	10,8	11,9	-1,1
	TASC5	35	10	140	30	9,9	11,9	-2,0
	TASC6	35	10	140	30	12,8	11,9	0,9
	TASC7	35	10	140	30	11,7	11,9	-0,2

* Moyenne des répliquions aux points du centre : $(11,9 \pm 1,3) \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$.

L'analyse statistique des valeurs observées et du modèle de régression est présentée dans le Tableau 22.

Tableau 22 Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse ; X_3 = température ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001$, $0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.

Composantes	Estimation des effets				Coefficient de régression (β)			
	Effet	S	t	p	Valeur	S	t	p
Constante	11948,96	789,34	15,1380	0,0000	254241,74	138086	1,8412	0,0842
X_1	-995,59	852,58	-1,1677	0,2600	-1428,48	2128	-0,6713	0,5116
X_1^2	960,92	781,07	1,2303	0,2364	19,22	15,6	1,2303	0,2364
X_2	-468,18	852,58	-0,5491	0,5905	-3072,22	11420	-0,2690	0,7914
X_2^2	-151,54	781,07	-0,1940	0,8486	-75,77	391	-0,1940	0,8486
X_3	52,23	852,58	0,0613	0,9519	-2773,25	1276	-2,1733	0,0451
X_3^2	1688,86	781,07	2,1622	0,0461	8,44	3,91	2,1622	0,0461
X_4	478,07	852,58	0,5607	0,5827	-362,29	999	-0,3628	0,7215
X_4^2	202,16	781,07	0,2588	0,7991	1,01	3,91	0,2588	0,7991
$X_1 * X_2$	151,81	1044,20	0,1454	0,8862	15,18	104	0,1454	0,8862
$X_1 * X_3$	-118,07	1044,20	-0,1131	0,9114	-1,18	10,4	-0,1131	0,9114
$X_1 * X_4$	-9,62	1044,20	-0,0092	0,9928	-0,10	10,4	-0,0092	0,9928
$X_2 * X_3$	655,31	1044,20	0,6276	0,5391	32,77	52,2	0,6276	0,5391
$X_2 * X_4$	-510,02	1044,20	-0,4884	0,6319	-25,50	52,2	-0,4884	0,6319
$X_3 * X_4$	834,16	1044,20	0,7989	0,4361	4,17	5,22	0,7989	0,4361

ANOVA, $R^2 = 0,37$					
Source de variabilité	SE	d.l.	ME	F	p
Modèle de régression	40350859	14	2882204	0,6608	0,7792
Résiduelle	69782028	16	4361377		
Manque d'ajustement	59311532	10	5931153	3,3988	0,0738
Erreur pure	10470496	6	1745083		
Totale	110132887	30			

Le coefficient R^2 du modèle est très faible (0,37). Seulement 37% de la variabilité de la réponse sont expliqués par le modèle. Il y a donc une faible corrélation entre les variables indépendantes et la réponse de la variable dépendante. Le modèle est peu précis pour prédire l'entomotoxicité de Btk HD-1. Seul l'effet quadratique de la température (X_3^2) est marginalement significatif. Le modèle de régression pour prédire l'entomotoxicité de Btk HD-1 dans les BES ayant subies une hydrolyse thermo-alkaline est défini par l'Équation 9.

Équation 9
$$Y = 254241,74 - 1428,48 \cdot X_1 - 3072,22 \cdot X_2 - 2773,25 \cdot X_3 - 362,29 \cdot X_4 + 19,22 \cdot X_1^2 - 75,77 \cdot X_2^2 + 8,44 \cdot X_3^2 + 1,01 \cdot X_4^2 + 15,18 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1,18 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,10 \cdot X_1 \cdot X_4 + 32,77 \cdot X_2 \cdot X_3 - 25,50 \cdot X_2 \cdot X_4 + 4,17 \cdot X_3 \cdot X_4$$

Où Y = entomotoxicité, X₁ = MES, X₂ = pH, X₃ = température, X₄ = durée.

Selon les résultats, le pH est le seul paramètre susceptible d'influencer l'entomotoxicité. Sa composante linéaire (X₂) a un effet négatif significatif sur l'entomotoxicité alors que sa composante quadratique (X₂²) a un effet positif significatif. L'impact de cette dernière est d'ailleurs important selon l'estimation des effets.

Les valeurs critiques des paramètres de ce traitement pour maximiser l'entomotoxicité sont présentées dans le Tableau 23. Si les valeurs optimales se situent dans la région expérimentale définie par le modèle mathématique, une entomotoxicité de 13,4x10³UI/μl pourrait être atteinte à un intervalle de confiance de 95% et de 16,4x10³UI/μl à un intervalle de prédiction de +95%.

Tableau 23 Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes de l'hydrolyse thermo-alkaline des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.

Valeurs critiques				Valeur prédite de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	Valeur maximale de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	
MES (g/l)	pH	Temp. (°C)	Durée (min)		Intervalle de confiance à 95%	Intervalle de prédiction à 95%
37,4	10,5	141,3	21,3	11,7	13,4	16,4

6.2.3 Traitement thermo-oxydant

6.2.3.1 Boues mixtes

Les résultats d'optimisation du traitement thermo-oxydant des boues mixtes sont présentés dans le Tableau 24. La moyenne des réplifications aux points du centre est (12,7±1,2)x10³UI/μl, soit une valeur inférieure (-50,4%) à celle obtenue lors de l'expérience préliminaire *Tho35c0.01* évaluée à 19,0x10³UI/μl. L'hydrolyse réalisée à pH 8 donne la plus grande entomotoxicité, soit 17,5x10³UI/μl. Le modèle prédit toutefois une valeur inférieure dans les mêmes conditions, soit 15,2x10³UI/μl. La valeur prédite la plus élevée (15,8x10³UI/μl) est obtenue avec l'expérience TOMK14 où l'hydrolyse est effectuée à pH 9 et 150°C pendant 40 min sur des BEM contenant 40 g MES/l.

Tableau 24 Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des BEM. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse ; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse ; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

PCC	Code	Variables indépendantes				Entomotoxicité (UIx10 ³ /µl)		
		X_1	X_2	X_3	X_4	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle
Points aux extrémités (K)	TOMK1	30	9	130	20	10,9	11,9	-1,1
	TOMK2	30	9	150	20	11,0	12,6	-1,6
	TOMK3	30	11	130	20	13,1	13,6	-0,5
	TOMK4	30	11	150	20	15,0	13,8	1,2
	TOMK5	30	9	130	40	10,9	12,6	-1,7
	TOMK6	30	9	150	40	13,0	12,9	0,1
	TOMK7	30	11	130	40	12,6	11,4	1,2
	TOMK8	30	11	150	40	10,8	11,3	-0,4
	TOMK9	40	9	130	20	14,2	13,3	0,9
	TOMK10	40	9	150	20	13,4	13,9	-0,5
	TOMK11	40	11	130	20	14,3	13,6	0,7
	TOMK12	40	11	150	20	15,8	13,7	2,1
	TOMK13	40	9	130	40	15,2	15,7	-0,4
	TOMK14	40	9	150	40	16,8	15,8	0,9
	TOMK15	40	11	130	40	15,1	13,1	2,0
	TOMK16	40	11	150	40	14,6	12,8	1,8
Points étoiles (E)	TOME1	25	10	140	30	14,2	12,2	2,0
	TOME2	45	10	140	30	12,0	15,1	-3,2
	TOME3	35	8	140	30	17,5	15,2	2,3
	TOME4	35	12	140	30	10,3	13,8	-3,4
	TOME5	35	10	120	30	11,9	11,9	0,0
	TOME6	35	10	160	30	11,1	12,3	-1,2
	TOME7	35	10	140	10	12,9	12,8	0,0
	TOME8	35	10	140	50	11,4	12,6	-1,2
Points au centre*	TOMC1	35	10	140	30	12,4	12,7	-0,3
	TOMC2	35	10	140	30	10,9	12,7	-1,7
	TOMC3	35	10	140	30	13,3	12,7	0,6
	TOMC4	35	10	140	30	14,7	12,7	2,1
	TOMC5	35	10	140	30	11,8	12,7	-0,9
	TOMC6	35	10	140	30	13,1	12,7	0,4
	TOMC7	35	10	140	30	12,4	12,7	-0,2

* Moyenne des réplifications aux points du centre : $(12,7 \pm 1,2) \times 10^3$ UI/µl.

L'ANOVA, l'estimation des effets et les coefficients de régression du modèle sont présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25 Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour le **traitement thermo-oxydant des BEM**. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.

Composantes	Estimation des effets				Coefficient de régression (β)			
	Effet	S	t	p	Valeur	S	t	p
Constante	12661,57	773,844	16,3619	0,0000	-18316,61	135375	-0,1353	0,8941
X_1	1476,39	835,847	1,7663	0,0964	-44,59	2086	-0,0214	0,9832
X_1^2	-505,33	765,741	0,6599	0,5187	10,11	15,3	0,6599	0,5187
X_2	-694,42	835,847	-0,8308	0,4183	-3420,82	11196	-0,3055	0,7639
X_2^2	913,83	765,741	1,1934	0,2501	456,91	383	1,1934	0,2501
X_3	211,49	835,847	0,2530	0,8035	561,24	1251	0,4486	0,6597
X_3^2	-282,17	765,741	-0,3685	0,7173	-1,41	3,83	-0,3685	0,7173
X_4	-106,84	835,847	-0,1278	0,8999	537,87	979	0,5494	0,5903
X_4^2	38,83	765,741	0,0507	0,9602	0,19	3,83	0,0507	0,9602
$X_1 * X_2$	-683,38	1023,700	-0,6676	0,5139	-68,34	102	-0,6676	0,5139
$X_1 * X_3$	-55,38	1023,700	-0,0541	0,9575	-0,55	10,2	-0,0541	0,9575
$X_1 * X_4$	818,94	1023,700	0,8000	0,4354	8,19	10,2	0,8000	0,4354
$X_2 * X_3$	-218,26	1023,700	-0,2132	0,8339	-10,91	51,2	-0,2132	0,8339
$X_2 * X_4$	-1429,97	1023,700	-1,3969	0,1815	-71,50	51,2	-1,3969	0,1815
$X_3 * X_4$	-180,72	1023,700	-0,1765	0,8621	-0,90	5,12	-0,1765	0,8621

ANOVA, $R^2 = 0,36$					
Source de variabilité	SE	d.l.	ME	F	p
Modèle de régression	37852345	14	2703739	0,6450	0,7923
Résiduelle	67069483	16	4191843		
Manque d'ajustement	58302900	10	5830290	3,9904	0,0520
Erreur pure	8766582	6	1461097		
Totale	104921828	30			

L'analyse ANOVA indique que le modèle est peu précis pour prédire l'entomotoxicité. Son coefficient R^2 indique que seulement 36% de la variabilité de la réponse est expliquée. De plus, aucun des effets n'est jugé statistiquement valable. Les coefficients de régression ont été intégrés dans l'Équation 10.

Équation 10
$$Y = -18316,61 - 44,59 \cdot X_1 - 3420,82 \cdot X_2 + 561,24 \cdot X_3 + 537,87 \cdot X_4 + 10,11 \cdot X_1^2 + 456,91 \cdot X_2^2 - 1,41 \cdot X_3^2 + 0,19 \cdot X_4^2 - 68,34 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,55 \cdot X_1 \cdot X_3 + 8,19 \cdot X_1 \cdot X_4 - 10,91 \cdot X_2 \cdot X_3 - 71,50 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,90 \cdot X_3 \cdot X_4$$

Où Y = entomotoxicité, X₁ = MES, X₂ = pH, X₃ = température, X₄ = durée.

Selon le test de Student, aucun des coefficients de régression n'est statistiquement significatif en raison de leur écart type trop élevé.

La MRS a permis d'identifier les valeurs critiques des variables indépendantes (Tableau 26). Si les valeurs optimales des paramètres du traitement ont bien été cernées, une entomotoxicité de 16,3x10³UI/μl serait obtenue à un intervalle de confiance de +95% et de 18,3x10³UI/μl à un intervalle de prédiction de +95%.

Tableau 26 Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes du traitement thermo-oxydant des BEM pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.

Valeurs critiques				Valeur prédite de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	Valeur maximale de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	
MES (g/l)	pH	Temp. (°C)	Durée (min)		Intervalle de confiance à 95%	Intervalle de prédiction à 95%
30,4	9,2	151,9	17,2	12,6	16,3	18,3

6.2.3.2 Boues secondaires

Les résultats d'entomotoxicité sont présentés dans le Tableau 27. La moyenne des réplifications au point du centre est évaluée à (14,1±1,5)x10³UI/μl. Cette valeur est similaire à celle obtenue lors de l'expérience préliminaire *Tho35c0.01*, soit 14,6x10³UI/μl. Une valeur élevée de 16,8x10³UI/μl est observée lorsque l'hydrolyse est réalisée à pH 11 et 150°C pendant 20 min sur des BES contenant 40 g MES/l. Une valeur légèrement inférieure de 15,0x10³UI/μl est prédite par le modèle dans les mêmes conditions. La plus forte entomotoxicité prédite par le modèle (16,2x10³UI/μl) est faite lorsque les BES contiennent peu de MES (25 g/l).

Tableau 27 Valeurs observées, prédites et résiduelles des entomotoxicités de Btk HD-1 pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

PCC	Code	Variables indépendantes				Entomotoxicité (UIx10 ³ /µl)		
		X_1	X_2	X_3	X_4	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle
Points aux extrémités (K)	TOSK1	30	9	130	20	12,6	10,2	2,4
	TOSK2	30	9	150	20	11,9	11,9	0,0
	TOSK3	30	11	130	20	15,8	14,6	1,2
	TOSK4	30	11	150	20	14,7	15,2	-0,5
	TOSK5	30	9	130	40	13,5	15,1	-1,5
	TOSK6	30	9	150	40	16,6	15,3	1,2
	TOSK7	30	11	130	40	15,9	15,2	0,7
	TOSK8	30	11	150	40	14,1	14,3	-0,2
	TOSK9	40	9	130	20	12,3	11,9	0,4
	TOSK10	40	9	150	20	13,4	14,1	-0,7
	TOSK11	40	11	130	20	12,6	13,9	-1,3
	TOSK12	40	11	150	20	16,8	15,0	1,8
	TOSK13	40	9	130	40	14,3	13,8	0,5
	TOSK14	40	9	150	40	13,6	14,6	-0,9
	TOSK15	40	11	130	40	11,7	11,5	0,2
	TOSK16	40	11	150	40	8,7	11,1	-2,5
Points étoiles (E)	TOSE1	25	10	140	30	14,6	16,2	-1,5
	TOSE2	45	10	140	30	16,0	14,7	1,3
	TOSE3	35	8	140	30	11,6	12,2	-0,6
	TOSE4	35	12	140	30	13,6	13,2	0,4
	TOSE5	35	10	120	30	10,8	12,1	-1,2
	TOSE6	35	10	160	30	14,5	13,5	1,0
	TOSE7	35	10	140	10	11,5	13,0	-1,6
	TOSE8	35	10	140	50	15,4	14,0	1,4
Points au centre*	TOSC1	35	10	140	30	14,2	14,1	0,1
	TOSC2	35	10	140	30	11,8	14,1	-2,3
	TOSC3	35	10	140	30	13,4	14,1	-0,7
	TOSC4	35	10	140	30	16,4	14,1	2,3
	TOSC5	35	10	140	30	13,3	14,1	-0,8
	TOSC6	35	10	140	30	15,3	14,1	1,2
	TOSC7	35	10	140	30	14,3	14,1	0,2

* Moyenne des répliquions aux points du centre : $(14,1 \pm 1,5) \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$.

Les résultats de l'analyse statistique du PCC sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28

Analyse de la variance (ANOVA), estimation des effets et coefficient de régression des composantes du modèle pour le traitement thermo-oxydant des BES. Variables indépendantes : X_1 = MES ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = temp. ; X_4 = durée. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0,001, 0,01$ ou $0,05$. Paramètres statistiques : SE = somme des écarts ; d.l. = degré de liberté ; ME = moyenne des écarts ; F = valeur du test de Fisher ; S = écart-type ; t = valeur du test de Student.

Composantes	Estimation des effets				Coefficient de régression (β)			
	Effet	S	t	p	Valeur	S	t	p
Constante	14095,30	664,33	21,2173	0,0000	-208233,15	116217	-1,7918	0,0921
X_1	-747,28	717,56	-1,0414	0,3132	271,30	1791	0,1515	0,8815
X_1^2	653,97	657,37	0,9948	0,3346	13,08	13,2	0,9948	0,3346
X_2	504,07	717,56	0,7025	0,4925	18620,09	9612	1,9372	0,0706
X_2^2	-691,01	657,37	-1,0512	0,3088	-345,50	329	-1,0512	0,3088
X_3	694,84	717,56	0,9683	0,3473	1261,34	1074	1,1745	0,2574
X_3^2	-659,84	657,37	-1,0037	0,3304	-3,30	3,29	-1,0037	0,3304
X_4	491,74	717,56	0,6853	0,5030	2228,87	840	2,6521	0,0174
X_4^2	-280,28	657,37	-0,4264	0,6755	-1,40	3,29	-0,4264	0,6755
$X_1 * X_2$	-1195,95	878,83	-1,3609	0,1924	-119,60	87,9	-1,3609	0,1924
$X_1 * X_3$	272,40	878,83	0,3100	0,7606	2,72	8,79	0,3100	0,7606
$X_1 * X_4$	-1490,01	878,83	-1,6955	0,1094	-14,90	8,79	-1,6955	0,1094
$X_2 * X_3$	-575,03	878,83	-0,6543	0,5222	-28,75	43,9	-0,6543	0,5222
$X_2 * X_4$	-2164,61	878,83	-2,4631	0,0255	-108,23	43,9	-2,4631	0,0255
$X_3 * X_4$	-737,70	878,83	-0,8394	0,4136	-3,69	4,39	-0,8394	0,4136

ANOVA, $R^2 = 0,54$					
Source de variabilité	SE	d.l.	ME	F	p
Modèle de régression	57099808	14	4078558	1,3202	0,2945
Résiduelle	49429478	16	3089342		
Manque d'ajustement	36418003	10	3641800	1,6793	0,2715
Erreur pure	13011476	6	2168579		
Totale	106529286	30			

Un coefficient R^2 de 0,54 signifie que 54% de la variabilité de la réponse est expliquée par le modèle. Seule l'interaction du pH avec la durée de l'hydrolyse est significative, mais l'effet n'est pas important. Le modèle de régression pour prédire l'entomotoxicité dans la région expérimentale étudiée est représenté par l'Équation 11.

Équation 11
$$Y = -208233,15 - 271,30 \cdot X_1 + 18620,09 \cdot X_2 + 1261,34 \cdot X_3 + 2228,87 \cdot X_4 + 13,08 \cdot X_1^2 - 345,50 \cdot X_2^2 - 3,30 \cdot X_3^2 - 1,40 \cdot X_4^2 - 119,60 \cdot X_1 \cdot X_2 + 2,72 \cdot X_1 \cdot X_3 - 14,90 \cdot X_1 \cdot X_4 - 28,75 \cdot X_2 \cdot X_3 - 108,23 \cdot X_2 \cdot X_4 - 3,69 \cdot X_3 \cdot X_4$$

Où Y = entomotoxicité, X_1 = MES, X_2 = pH, X_3 = température, X_4 = durée.

Selon les résultats, le coefficient linéaire de la durée de l'hydrolyse (X_4) a un effet positif significative, mais son importance est peu significative ($p=0,5$). L'interaction entre la durée de l'hydrolyse et du pH ($X_2 \cdot X_4$) détient un coefficient négatif qui est marginalement significatif. Cette interaction est illustrée à la Figure 19 en conservant les MES et la température de l'hydrolyse à des valeurs constantes. Lorsque le pH et la durée augmentent, l'entomotoxicité de Btk HD-1 augmente (et vice-versa). Toutefois, lorsque le traitement est prolongé à des valeurs très élevées de pH (et vice-versa), l'entomotoxicité peut diminuer.

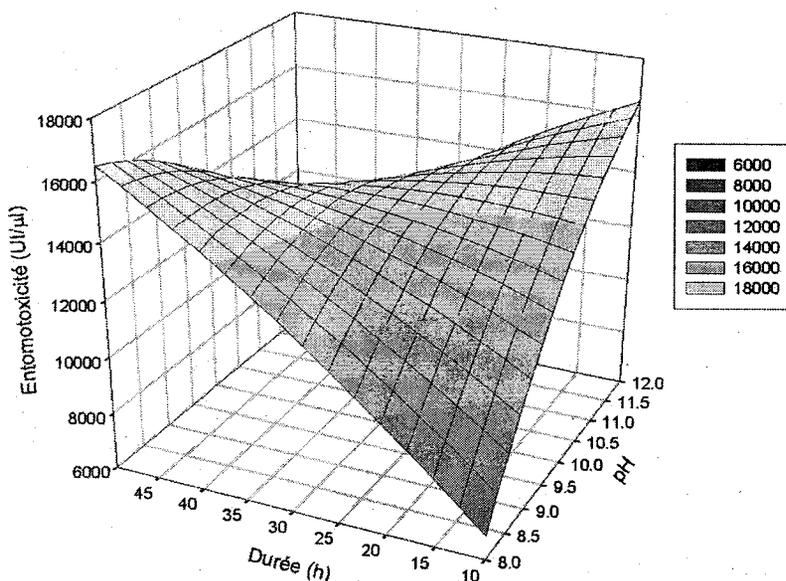


Figure 19 Réponse en surface de l'entomotoxicité en fonction du pH et de la durée de l'hydrolyse thermo-alkaline du traitement thermo-oxydant des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la température de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g/l et 140°C.

Finalement, la MRS a permis de déterminer les conditions optimales des paramètres de l'hydrolyse thermo-alkaline du traitement thermo-oxydant (Tableau 29). Le modèle prédit une entomotoxicité de $15,5 \times 10^3$ UI/μl à un intervalle de confiance de +95% et de $18,1 \times 10^3$ UI/μl à un intervalle de prédiction de +95%.

Tableau 29 Valeurs critiques (optimales) des variables indépendantes du traitement thermo-oxydant des BES pour obtenir un rendement maximal en entomotoxicité.

Valeurs critiques				Valeur prédite de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	Valeur maximale de l'entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) aux valeurs critiques	
MES (g/l)	pH	Temp. (°C)	Durée (min)		Intervalle de confiance à 95%	Intervalle de prédiction à 95%
36,4	9,8	146,6	30,3	14,1	15,5	18,1

6.2.4 Discussion sur les travaux d'optimisation

6.2.4.1 Précision et adéquation des modèles polynomiaux

Dans ce travail, un seul des modèles polynomiaux est très précis pour prédire la réponse en surface du plan expérimental. Le coefficient de détermination du modèle pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM est élevé ($R^2=0,9$), mais il est faible pour les autres traitements ($R^2=0,36$ à $0,63$).

Pour améliorer la précision des modèles ayant un faible R^2 , il est possible de les réajuster en retirant une ou deux variables indépendantes dont les effets sont négligeables sur la réponse de la variable dépendante. Les effets négligeables peuvent affecter la précision des modèles. Il est possible aussi de retirer un ou plusieurs effets interactifs, quadratiques et/ou linéaires pour que les modèles puissent prédire adéquatement la réponse. Normalement, plus il y a de termes dans l'équation de régression, meilleur est le coefficient de détermination. Cependant, il est souhaitable d'avoir l'équation la plus simple pour prédire la réponse même si cela peut diminuer légèrement le R^2 . Les variables ou les effets retirés ne pourront pas interférer avec les effets forts et/ou significatifs. Si des recherches se poursuivent avec les modèles développés dans ce travail, il serait souhaitable de les réajuster en éliminant des termes de l'équation de régression. L'élimination des termes devra alors être effectuée de façon rigoureuse en respectant la théorie de l'analyse de la régression. L'ouvrage de Draper et Smith (1998) est une excellente référence sur ce sujet.

Pour chaque modèle, la signifiante du manque d'ajustement a été évaluée par l'analyse ANOVA. Dans tous les cas étudiés, il n'y a aucun manque d'ajustement car leur valeur p n'est pas significative ($p>0,05$). Les modèles sont adéquats pour estimer la réponse en surface de leur PCC respectif, particulièrement le traitement thermo-alkalin des BEM dont le modèle est hautement significatif. La signifiante du manque d'ajustement a été mesurée avec l'erreur pure des modèles. Plus la valeur de l'erreur pure est basse, meilleure est la reproductibilité des données

expérimentales. Par ordre de grandeur, la reproductibilité des traitements optimisés serait : TAM>AS>TOM>TAS>TOS.

6.2.4.2 Entomotoxicités observées lors des essais préliminaires vis-à-vis celles observées aux points centraux des PCC

Les expériences aux points centraux des PCC ont été réalisées dans les mêmes conditions que les essais préliminaires des traitements sélectionnés. Dans trois cas sur cinq (ALS, TAM et TOM), des baisses d'entomotoxicité de plus de 30% ont été observées. Cette observation ne met pas en cause la reproductibilité des résultats car il est démontré que les traitements sélectionnés sont reproductibles selon l'erreur pure des résultats aux points centraux des PCC (voir sous-section précédente). Des boues échantillonnées à des dates différentes ont été utilisées pour les essais préliminaires (BEM1, BEM2, BES1, BES2) et les travaux d'optimisation (BEM4, BEM5, BES4-BES6). La composition variable de ces boues (voir section 4.1.3) est peut-être responsable des différences observées.

Pour le traitement ALS, les boues BES1 et BES4 ont été utilisés respectivement pour les essais préliminaires et les travaux d'optimisation (voir l'Annexe 6 pour leur composition initiale). Les boues BES1 ont été échantillonnées au mois de juillet alors que les boues BES4 ont été récoltées au mois d'avril. Ces dernières étaient plus concentrées en COT et en éléments inorganiques. La variabilité saisonnière des affluents de la Ville de Québec est une source potentielle de variation de la composition des boues (voir l'Annexe 6). La composition du milieu était différente et cela a possiblement influencé l'entomotoxicité. Cependant, la même situation est survenue avec le traitement TAS et aucune baisse d'entomotoxicité n'a été observée. Les essais préliminaires ont été effectués sur les boues BES2, échantillonnées au mois de septembre, alors que les travaux d'optimisation ont été réalisés avec les boues BES5, récoltées au mois de mai. Leur contenu en N_t et en COT ainsi que le ratio C/N étaient différents d'une boue à l'autre sans pour autant affecter l'entomotoxicité. Dans ce cas-ci, il est possible que l'hydrolyse thermo-alkaline ait joué un rôle important en offrant à Btk HD-1 des conditions de culture similaires avec deux boues secondaires dont la composition initiale était différente.

Pour le traitement TOS où aucune baisse n'a été observée, les boues utilisées pour les essais préliminaires (BES2) et l'optimisation (BES6) ont été récoltées au mois de septembre. Quoique les boues avaient une composition en N_t et en $N-NH_4^+$ et un ratio C/N différents, l'impact de la variabilité saisonnière des affluents sur la composition des boues était négligeable puisqu'elles ont

été échantillonnées au cours du même mois. Les caractéristiques des boues, autres que le N_6 , le $N-NH_4^+$ et le ratio C/N, avaient peu de différence. Les conditions de culture étaient similaires et les entomotoxicités n'ont pas varié.

Pour les traitements TAM et TOM, les boues BEM4 et BEM5 ont respectivement été utilisées pour les travaux d'optimisation. Elles ont été récoltées au mois d'avril (BEM4) et au mois de juillet (BEM5). Les essais préliminaires pour ces deux traitements ont été conduits sur les boues BEM2 récoltées au mois de septembre. Les boues ont été échantillonnées à différentes saisons et peuvent avoir une composition différente en raison de la variabilité saisonnière des affluents de la Ville de Québec. Par exemple, les boues BEM4 contenaient plus de COT que les boues BEM2 (voir l'Annexe 6). Il est possible que la composition des boues mixtes explique les différences observées entre les résultats des essais préliminaires et des expériences aux points centraux des PCC. Mohammedi (2004) avait d'ailleurs observé que l'entomotoxicité de Bt pouvaient varier dans les boues d'épuration mixtes en fonction de la saison d'échantillonnage.

Les résultats indiquent que la composition des boues est très importante pour le procédé BT-INRS. La variabilité des caractéristiques des boues constitue le plus important risque technologique qu'il faut maîtriser avant la commercialisation du procédé. Pour l'instant, la production de souches entomopathogènes de Bt pourrait se faire avec une boue récoltée à un moment opportun de l'année où la demande du bio-insecticide est forte dans le marché ciblé. Par exemple, l'atomisation de Btk HD-1 pour contrôler la TBE dans les forêts québécoises s'effectue au début de l'été après que les bourgeons s'ouvrent et dévoilent les larves cachées à l'intérieur. Le procédé BT-INRS pourrait produire un bio-insecticide de Btk applicable dans les forêts canadiennes durant le mois de juin (ou de juillet) de chaque année. Dans un contexte où une entreprise acquerrait le procédé BT-INRS et diversifierait ses produits commerciaux, des productions différentes de souches entomopathogènes de Bt ou autres agents de biocontrôle pourraient s'effectuer au cours des autres mois de l'année. Cependant, si des produits biologiques en demande constante (ex. : enzymes industrielles) sont fabriqués à partir de boues d'épuration ou autres biomasses résiduelles, il serait alors important de contrôler la variabilité de la matière première avant de se lancer dans la production à grande échelle. Les études sur la variabilité des boues doivent donc être poursuivies afin de maîtriser cet important risque technologique.

6.2.4.3 Détermination des valeurs optimales

Dans ce travail, la MRS est utilisée pour déterminer les valeurs des variables indépendantes qui permettront d'obtenir une réponse maximale de la variable dépendante. La MRS détermine les

valeurs optimales en mesurant et en illustrant la réponse en surface. Les effets quadratiques et interactifs contenus dans les modèles polynomiaux de second ordre influencent la forme tridimensionnelle de la réponse en surface. Une réponse en surface en forme de dôme est recherchée car le point à la surface représente les valeurs optimales. Dans ce travail, tous les effets interactifs ont été portés en graphique et seulement les effets significatifs ont été présentés. Une seule des réponses en surface avait une forme de dôme, il s'agit de l'interaction du pH et de la température du traitement thermo-oxydant des boues secondaires (voir Figure 20). Cette dernière n'est cependant pas significative selon les tests statistiques appliqués sur l'ANOVA, l'estimation des effets et les coefficients de régression. Cela signifie que les valeurs optimales des autres traitements ne se situent pas dans la région explorée et qu'il est nécessaire de poursuivre le travail d'optimisation. Les données de ce travail pourraient servir dans des travaux ultérieurs à déterminer de nouvelles valeurs optimales provisoires en élaborant un second PCC dont la région expérimentale contiendrait cette fois-ci les valeurs optimales.

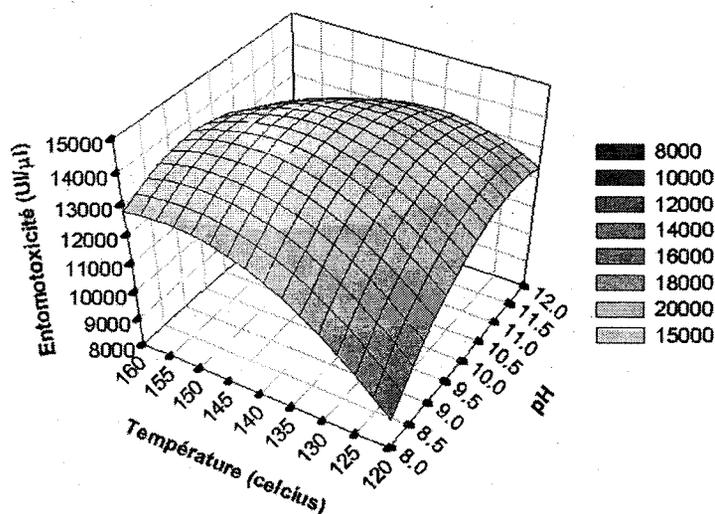


Figure 20 Réponse en surface de l'entomotxicité en fonction du pH et de la température de l'hydrolyse thermo-alkaline du traitement thermo-oxydant des BES où les valeurs (fixes) de la concentration en MES et de la durée de l'hydrolyse correspondent à celles des points du centre du PCC, soit 35 g/l et 30 min.

Une étape importante lors de l'optimisation est de bien choisir les valeurs optimales provisoires et de leurs intervalles pour déterminer les points aux extrémités et les points étoiles du PCC. Dans ce travail, les valeurs optimales provisoires ont été choisies à partir des expériences préliminaires. Selon les résultats, les valeurs optimales provisoires et leurs intervalles n'ont pas permis de cerner les valeurs optimales exactes. Avant d'entamer les expériences de chaque PCC, il aurait été préférable de faire une seconde expérience préliminaire avec les valeurs optimales provisoires pour

connaître l'orientation vers la réponse maximale. Cela aurait permis de raffiner les valeurs optimales provisoires et de délimiter une région expérimentale contenant potentiellement les valeurs optimales. Par exemple, Box et al. (1978) recommande de réaliser une courte expérience factorielle de premier ordre (sans effet quadratique et interactif) à deux variables indépendantes et deux niveaux avec trois réplifications aux valeurs optimales provisoires. Les courbes de contour des résultats de ce PCC sont calculées et transposées sur un graphique de surface en deux dimensions. La méthode de la plus grande ascension (« steepest ascent method ») est ensuite utilisée pour dresser un chemin vers les valeurs optimales. Le chemin est normalement perpendiculaire aux courbes de contour et les meilleures réponses de la variable dépendante indiquent sa direction. Quelques expériences sont alors réalisées sur ce chemin et selon les résultats, de nouvelles valeurs optimales provisoires sont déterminées. Ce type d'expérience est appelé « expérience de tamisage » (« screening experiments »).

Bien que les valeurs optimales des traitements n'aient pas été cernées avec exactitude, les modèles donnent de l'information sur les effets significatifs des paramètres des traitements envers l'entomotoxicité de Btk. Ces effets sont discutés dans la prochaine sous-section.

6.2.4.4 Effets significatifs des paramètres des traitements sur l'entomotoxicité

La MRS a permis d'évaluer l'impact des variables indépendantes (paramètres des traitements) sur la réponse de la variable dépendante (entomotoxicité). Seules les composantes des modèles ayant des effets significatifs de forte intensité et les coefficients de régression significatifs sont discutés dans les prochaines sous-sections.

6.2.4.4.1 Hydrolyse alcaline des boues secondaires

Le modèle de régression indique que la température de l'hydrolyse a une forte interaction positive et significative avec le pH. Selon la Figure 14, le modèle prédit une entomotoxicité plus élevée lorsque le pH augmente et que la température diminue. Le pH et la température du traitement modifient à différents degrés les teneurs en COD et en protéines dissoutes ainsi que la viscosité et les teneurs en éléments inorganiques, soit des facteurs importants influençant l'entomotoxicité de Btk HD-1 dans les boues (chapitre 5). Même à des pH alcalins élevés, l'hydrolyse alcaline réalisée à de très hautes températures peut modifier la structure moléculaire des protéines, des polysaccharides ou autres PEC qui deviennent inaptes à l'assimilation bactérienne. Btk HD-1 est alors incapable d'accroître son entomotoxicité si les molécules essentielles à la formation de métabolites insecticides n'ont pas la conformité métabolique requise.

Dans ce travail, une faible variation de la température a été étudiée pour l'hydrolyse alcaline (de 25°C à 35°C). La forte interaction avec le pH suggère qu'une faible variation de la température puisse influencer la performance des hydrolyses réalisées à des pH alcalins élevés. Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier l'effet de la température à des valeurs se situant entre 40°C et 110°C car, selon Vlyssides et Karlis (2004), la quantité de COD dans les boues est augmenté par une hydrolyse alcaline (pH 11) à une température de 90°C. Comme le COD est un paramètre important pour la production de Btk HD-1 dans les boues, il serait souhaitable d'explorer dans des travaux ultérieurs cet intervalle de température.

6.2.4.4.2 Hydrolyse thermo-alcaline des BEM

La composante linéaire des MES a un impact très positif sur l'entomotoxicité. Plus les boues hydrolysées sont concentrées en MES, plus il y a d'éléments nutritifs disponibles pour la croissance bactérienne, la sporulation et la formation de métabolites secondaires. Btk HD-1 y trouve son compte pour produire des métabolites insecticides en grande quantité et augmenter l'entomotoxicité du bouillon fermenté.

La composante linéaire du pH est particulièrement importante et statistiquement significative. Comme son impact est positif, cela indique qu'une hydrolyse thermo-alcaline à un pH alcalin élevé permet d'avoir de bons rendements en entomotoxicité. Un pH alcalin élevé lors d'une hydrolyse thermo-alcaline améliore la solubilisation des composants des boues (Dèlgenes et al., 2000 ; Penaud et al., 1999) et rend accessible une plus grande quantité d'éléments nutritifs à Btk HD-1 pour la production de métabolites insecticides.

L'effet qui a le plus d'impact sur l'entomotoxicité est celui causé par l'interaction entre les MES et la durée de l'hydrolyse. Cette interaction a un impact très positif et significatif sur l'entomotoxicité. L'hydrolyse doit durer plus longtemps pour solubiliser des boues très concentrées en MES. Le prolongement de la durée de traitement peut entraîner une solubilisation accrue de la matière organique présente en grande quantité et une diminution importante de la viscosité. Le prolongement de la durée peut briser les cellules qui sont présentes en plus grande quantité afin de libérer plus d'éléments nutritifs comme plusieurs PEC. Cela signifie globalement une hausse du contenu en carbone organique, en protéines et en éléments inorganiques dans la phase soluble tout en diminuant considérablement la viscosité. Ces conditions seraient très favorables pour la production de métabolites insecticides par Btk HD-1 (chapitre 5). Si les MES sont présents en plus faible quantité, une longue hydrolyse pourrait dégrader davantage la matière organique et briser des molécules qui seraient autrement assimilées par Btk HD-1.

6.2.4.4.3 Hydrolyse thermo-alkaline des boues secondaires

La composante quadratique de la température a un impact positif et significatif sur l'entomotoxicité. À une température de l'hydrolyse thermo-alkaline près du niveau inférieur (120°C) ou supérieur (160°C), l'entomotoxicité de Btk HD-1 dans les boues hydrolysées serait élevée. Les effets sur la solubilité et la conformation métabolique des molécules sont différentes à ces deux niveaux, mais apparemment positifs sur l'entomotoxicité. Pour une question de coût d'énergie si l'hydrolyse devient une étape de traitement en amont dans le procédé BT-INRS, il serait souhaitable d'étudier davantage l'hydrolyse thermo-alkaline au niveau inférieur de température (120°C) et déterminer les valeurs de la concentration en MES, du pH et de la durée de l'hydrolyse optimales. Si de fortes entomotoxicités sont atteintes, il serait envisageable de remplacer l'étape conventionnelle de stérilisation (121°C) par une hydrolyse thermo-alkaline à une température aux alentours de 120°C. Cette alternative à la stérilisation est discutée dans la section 6.3.2.2.11.

6.2.4.4.4 Traitement thermo-oxydant des boues mixtes

Pour ce traitement, aucun effet ou coefficient de régression n'est significatif. Cela indique que toutes les variables indépendantes sélectionnées n'ont pas d'impacts significatifs sur la réponse de la variable dépendante dans la région expérimentale explorée. Les paramètres du traitement peuvent certainement avoir des impacts sur l'entomotoxicité, mais les probabilités qu'ils surviennent sont plus ou moins faibles. Il suffirait de créer un modèle d'un ordre supérieur pour déceler des interactions complexes entre les composantes linéaires et quadratiques des variables indépendantes. Cette possibilité n'a pas été explorée dans ce travail.

6.2.4.4.5 Traitement thermo-oxydant des boues secondaires

Une faible interaction négative et significative entre le pH et la durée de l'hydrolyse a été décelée par le modèle de régression. Cela signifie que la combinaison du pH et de la durée peut avoir un impact négatif sur l'entomotoxicité si, selon la figure 19, la partie thermo-alkaline de ce pré-traitement s'effectue à faible pH et courte durée ou à pH élevé et longue durée. La première possibilité influence peu la biodisponibilité des nutriments dans les boues. La deuxième possibilité hydrolyse libère des nutriments, mais elle brise les éléments et les rend inaptes à l'assimilation bactérienne (ex. : solubilisation accrue des protéines et dénaturation subséquente). Ces deux possibilités n'offrent pas des conditions de culture permettant à Btk HD-1 d'accroître son entomotoxicité.

6.2.4.5 Commentaires sur les méthodes expérimentales statistiques pour l'optimisation des traitements en vue d'accroître l'entomotoxicité de Bt

Il n'est pas possible pour l'instant de faire des comparaisons avec les travaux d'optimisation d'autres chercheurs. Le présent travail est à notre connaissance le premier travail d'optimisation sur le traitement du milieu de culture (les boues) en vue d'accroître le rendement d'un procédé biologique (procédé BT-INRS). Chen et al. (2002) répertorient plusieurs travaux dans lesquels les auteurs traitent seulement de l'optimisation d'un milieu de culture (ajout, omission ou variation d'ingrédients), du processus de fermentation (pH, durée...), de paramètres de préservation des aliments ou de l'hydrolyse enzymatique du canola. Normalement, les variables dépendantes lors de l'optimisation de procédés biologiques sont des concentrations de produits microbiens (ex. : cellules, spores, toxines, enzymes...) ou l'activité enzymatique. Elles sont mesurées par des méthodes quantitatives (dénombrement cellulaire, réaction colorimétrique...) différentes de celle préconisée dans ce travail, soit les bio-essais. Selon la littérature consultée, seul Abdel-Hameed (2001) a publié un article sur l'utilisation du PCC et de la MRS pour optimiser le processus de fermentation et prédire l'entomotoxicité de Bt cultivée dans un milieu semi-synthétique à base de soja et de mélasse⁸⁸. L'auteur a utilisé les bio-essais pour mesurer la variable dépendante de son PCC, mais les données sur les résultats statistiques de son travail sont limitées.

En ce qui concerne les effets des paramètres des traitements sur la composition des boues, ils sont bien documentés dans la littérature consultée, mais les études se restreignent à quelques valeurs seulement et se concentrent sur la stabilisation et le conditionnement des boues. Ce travail se démarque des autres études en analysant une vaste gamme de valeur pour chaque paramètre et ce, dans un contexte de fermentation où des métabolites secondaires sont produits (et non des métabolites primaires comme les acides gras volatiles ou le méthane). Cependant, les données de ce travail n'informent pas sur les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des boues traitées sous les différentes conditions définies avec les PCC. Les travaux d'optimisation indiquent clairement que les paramètres de plusieurs traitements ont des effets positifs ou négatifs de différents degrés sur l'entomotoxicité de Btk HD-1. Lors de recherches ultérieures, il serait

⁸⁸ Abdel-Hameed (2001) a optimisé le processus de fermentation afin de maximiser l'entomotoxicité de Bt var *israelensis* (Bt H-14) cultivée dans un milieu semi-synthétique à base de soja et de mélasse (volume de travail de 10 litres). Le PCC avait 4 variables indépendantes (aération, agitation, concentration initiale de mélasse et pH). La variable dépendante était le rendement en toxines mesuré par un bio-essai sur les larves de *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) et exprimé en UI/mg. À partir des données expérimentales, l'auteur est parvenu à un modèle de régression très précis ($R^2 = 0,89$) avec lequel il a obtenu les conditions optimales de fermentation. Il donne cependant peu d'information sur la signification des effets des variables indépendantes et d'autres paramètres statistiques de l'ANOVA et de l'analyse de régression.

souhaitable d'étudier plus en profondeur les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des boues traitées, particulièrement aux points étoiles des PCC.

En somme, les résultats des travaux d'optimisation indiquent qu'il est possible d'appliquer des méthodes expérimentales statistiques pour optimiser les traitements des boues avant leur fermentation. Le PCC et la MRS sont adéquats pour planifier les expériences et générer des réponses en surface pour mieux comprendre les effets des variables indépendantes. Cependant, il est important de réaliser des expériences de tamisage afin de bien élaborer la région expérimentale dans laquelle les valeurs optimales se situent. Il est possible d'obtenir des coefficients de détermination élevés pour les modèles de second ordre comme en témoignent les résultats pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM ($R^2=0,9$). Dans certains cas, ces modèles devraient être réajustés pour améliorer leur précision. Ces réajustements sont cependant laborieux et l'ensemble des possibilités n'a pas été exploré dans ce travail. Finalement, il serait souhaitable dans des travaux ultérieurs de poursuivre l'optimisation en s'inspirant des présents résultats. De cette façon, des réponses en surface permettront d'identifier avec exactitude les valeurs optimales (surface tridimensionnelle en forme de dôme). Pour l'instant, les valeurs optimales de ce travail ont été étudiées de manière approfondie dans des expériences en fioles Erlenmeyer et en fermenteur de 15 litres. Les essais réalisés avec les valeurs optimales des tableaux 17, 20, 23, 26 et 29 sont présentés dans la prochaine section.

6.3 Validation des conditions optimales des traitements

Les valeurs optimales des paramètres des traitements ont été vérifiées dans une série d'expérience en fioles Erlenmeyer. Elles ont également été testées en fermenteur de 15 litres. Les boues utilisées étaient BEM6 et BES7 pour les expériences de validation et BES8 pour les essais en fermenteur. Leur composition est disponible à l'Annexe 6.

6.3.1 Expériences de validation en fioles Erlenmeyer

6.3.1.1 Résultats

Les résultats des expériences de validation en fioles Erlenmeyer sont présentés dans le Tableau 30. Des comparaisons sont faites avec des fermentations contrôles, soit le milieu conventionnel à base de soja pour la production de Btk HD-1 et des boues contenant à 25 g MES/l. L'activité protéolytique et le contenu final en protéines solubles sont deux nouveaux paramètres analysés.

Tableau 30 Résultats des essais en fioles Erlenmeyer pour vérifier les conditions optimales pour chaque traitement. Fermentation par Btk HD-1 des boues d'épuration mixtes (BEM) et secondaires (BES) ainsi que du milieu semi-synthétique à base de soja. Résultats après 48h de fermentation. Les valeurs sont les moyennes de deux réplifications.

Substrat	Traitement	[MES] initiale (g/l)	Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)		Entomotox. (UIx10 ³ /μl)		Ratio <i>Tx/spores</i> (UI/1x10 ⁵ spores)	Sporul. (%)	<i>Act.proteo.</i> (UI/ml)		Contenu en prot.solubles (mg/ml)		Ratio <i>Tx/prot.</i> <i>solubles</i> (UI/mg)	Ratio <i>Act.proteo./</i> <i>prot.solubles</i> (UI/mg)
			Valeur	Diff. (%) ¹	Valeur	Diff. (%) ¹			Valeur	Diff. (%) ¹	Valeur	Diff. (%) ¹		
Soja	Aucun		54,9		6,9		0,013	83,8	0,16		4,61		1,50	0,11
BEM	Aucun (contrôle)	25,0	33,6		10,8		0,032	83,9	0,91		0,91		11,82	0,99
	Thermo- alcalin (TAM)	37,2	34,0	-0,1	16,3	51	0,048	62,2	1,38	53,8	1,05	15,1	15,53	1,32
	Thermo- oxydant (TOM)	25,9	45,3	35,0	15,6	44	0,034	74,9	1,29	43,7	0,54	-40,9	28,92	2,39
BES	Aucun (contrôle)	25,0	50,5		12,3		0,024	89,1	0,08		1,12		11,03	0,07
	Alcalin (ALS)	37,4	39,8	-21,3	14,9	21	0,037	79,5	0,00	-100	0,83	-26,2	18,05	0,00
	Thermo- alcalin (TAS)	30,4	36,0	-28,7	16,4	33	0,046	75,3	0,03	-65,6	1,20	7,0	13,71	0,02
	Thermo- oxydant (TOS)	36,4	48,3	-4,5	17,7	44	0,037	83,7	0,46	461	1,03	-8,2	17,29	0,45

¹Écart relatif en pourcentage par rapport à leur contrôle respectif (calculé avec les données brutes).

Par rapport aux boues, Btk HD-1 produit plus de spores dans le milieu soja. Le milieu soja contient aussi beaucoup de protéines solubles à la fin de la fermentation. Toutefois, l'entomotoxicité est beaucoup plus faible que celle obtenue dans les boues⁸⁹. Quant à l'activité protéolytique, elle est plus faible dans le milieu soja que celle observée dans les BEM, mais elle est supérieure à celle des BES (sauf pour le traitement TOS). Les ratios *Tx/spores* et *Tx/prot.solubles* du milieu soja sont inférieurs à ceux obtenus dans les boues.

Le traitement des BEM permet à Btk HD-1 d'atteindre des fortes entomotoxicités et activités protéolytiques par rapport au contrôle. Les ratios *Tx/prot.solubles* et *Act.proteo./prot.solubles* sont

⁸⁹ En comparaison avec Vidyarthi et al. (2002), l'entomotoxicité observée dans le milieu soja (fiole Erlenmeyer, souche Btk HD-1) est plus faible (6,9x10³UI/μl vis-à-vis 9,7x10³UI/μl), mais le nombre de spores et le pourcentage de sporulation sont sensiblement les mêmes. Tyagi et al. (2002) ont reporté une valeur de 6,0x10³UI/μl dans le milieu soja avec les mêmes conditions de culture. De plus, Vidyarthi et al. (2002) ont étudié la fermentation de BES de la Ville de Québec ajustées à 25 g MES/l. Par rapport à l'expérience contrôle du présent travail, les entomotoxicités et le nombre de spores sont sensiblement les mêmes.

plus élevés avec les BEM traitées. Ces ratios sont plus élevés avec le traitement thermo-oxydant à cause du faible contenu final en protéines solubles. Le traitement thermo-alkalin permet d'utiliser des BEM très concentrées en solides (plus de 37 g MES/l). Les bons rendements du traitement thermo-oxydant des BEM (TOM) sont obtenus à une concentration en MES (25,9 g/l) similaire au contrôle (25 g/l).

Le traitement des BES accroît également l'entomotoxicité de Btk HD-1 et permet d'utiliser des boues plus concentrées en MES (jusqu'à 37,4 g MES/l). Le nombre final de spores n'augmente pas et diminue dans certains cas. Les ratios *Tx/spores* sont plus élevés que le contrôle. Le traitement thermo-oxydant des BES (TOS) augmente l'activité protéolytique alors que les deux autres traitements (ALS et TAS) la diminuent. Aucune activité protéolytique n'est observée avec l'hydrolyse alcaline des BES. Le contenu final en protéines solubles varie peu d'une boue à l'autre. Les ratios *Tx/prot.solubles* sont plus élevées avec les BES hydrolysées. Seul le ratio *Act.proteo./prot.solubles* du traitement thermo-oxydant (TOS) se démarque du contrôle.

En comparant les BEM avec les BES, l'activité protéolytique est plus élevée dans les BEM que les BES. Les différentes concentrations initiales en MES ne semblent pas être responsables des légères variations de l'entomotoxicité et du nombre final de spores pour les BEM (Contrôle, TAM, TOM) et leur homologue dans les BES (Contrôle, TAS, TOS).

Les différences des valeurs observées d'entomotoxicité vis-à-vis les valeurs prédites par les modèles (section 6.2) sont illustrées à la Figure 21.

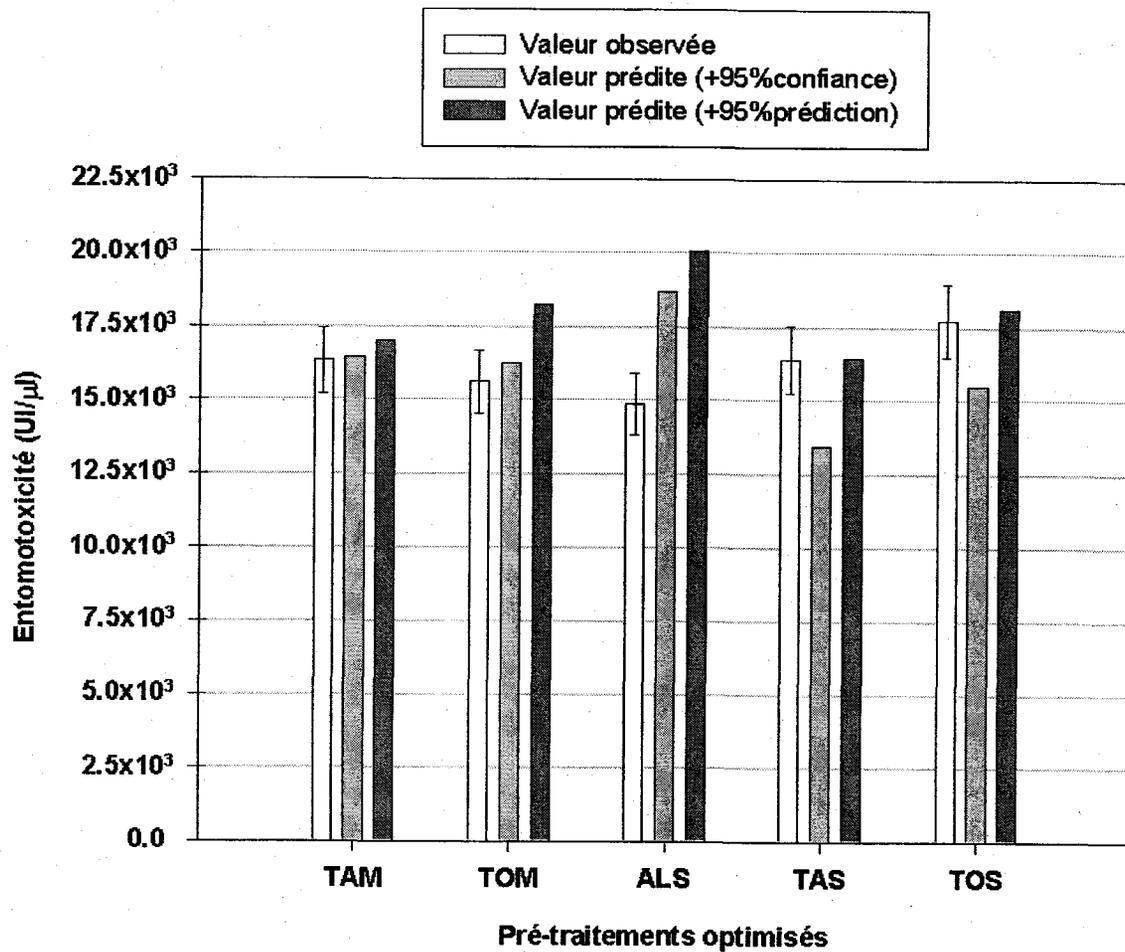


Figure 21 Validation en fioles Erlenmeyer des conditions optimales pour chaque traitement afin de maximiser le rendement en entomotoxicité de Btk HD-1 cultivées dans les boues. Écart type des valeurs observées calculées avec l'erreur de la méthode des bio-essais (7%). TAM = Hydrolyse thermo-alcaline des BEM ; TOM = Traitement thermo-oxydant des BEM ; ALS = Hydrolyse alcaline des BES ; TAS = Hydrolyse thermo-alcaline des BES ; TOS = Traitement thermo-oxydant des BES.

En considérant l'erreur de la méthode des bio-essais (7%), l'hydrolyse thermo-alcaline des BEM (TAM) et les traitements des BES (TAS et TOS) permettent d'obtenir des entomotoxicités dont les valeurs varient de moins de 5% par rapport aux valeurs prédites à un intervalle de prédiction de +95%. Le traitement thermo-oxydant des BEM (TOM) et l'hydrolyse alcaline des BES (ALS) donnent des entomotoxicités inférieures de 15% et 26% par rapport aux valeurs prédites à un intervalle de prédiction de +95%. En ce qui concerne les valeurs prédites à un intervalle de confiance de +95%, seuls les traitements des BEM donnent des valeurs du même ordre.

6.3.1.2 Discussion

Le milieu soja offre d'excellentes conditions pour la formation de spores, mais les protéases alcalines et les métabolites insecticides semblent peu nombreux ou faiblement actifs. Plusieurs des métabolites secondaires insecticides de Btk HD-1 sont de nature protéique. Une teneur très élevée en protéines solubles a été observée dans ce milieu. Cela suggère que les protéines solubles mesurées dans le bouillon fermenté sont pour la plupart des molécules sans pouvoir insecticide qui ont été secrétées par Btk HD-1 ou libérées suite à la lyse cellulaire. Si Btk HD-1 n'a pas assimilé entièrement les protéines de la farine de soja, quelques protéines solubles résiduelles peuvent contribuer à la forte teneur observée. Pour les protéases, les conditions de fermentation en fioles Erlenmeyer sont normalement défavorables à leur production. Le pH et l'aération sont deux facteurs importants pour leur production qui ne sont pas contrôlés en fiole Erlenmeyer. Il est possible qu'elles soient présentes en faible quantité dans le milieu, ce qui limiterait l'activité protéolytique.

L'entomotoxicité de Bt dans les boues (hydrolysées ou non) est nettement supérieure à celle observée dans le milieu soja. Les boues peuvent créer des conditions favorables à la production de spores plus performantes et de métabolites secondaires insecticides en grande quantité et/ou plus fonctionnels en terme de pouvoir insecticide. À ce propos, les hypothèses plausibles sont énumérées dans le Tableau 31.

Tableau 31 Hypothèses plausibles quant à la production de spores et de métabolites insecticides en grande quantité et/ou plus fonctionnels dans les boues d'épuration.

Hypothèses	Explications	
Fonctionnalités des spores	Le prolongement du processus de sporulation dans les boues permettrait aux spores d'atteindre leur pleine maturité avant la lyse cellulaire. Lorsque les spores sont matures, leur activité insecticide fonctionne à pleine capacité. Les ratios <i>Tx/spores</i> sont d'ailleurs plus élevés dans les boues que dans le milieu soja, ce qui suggère que les spores soient plus entomotoxiques. Si les spores sont plus entomotoxiques parce qu'elles sont matures, les CPI seraient possiblement complets et leur activité insecticide fonctionnerait aussi à pleine capacité. Les spores peuvent être plus entomotoxiques parce que leurs couches protéiques contiennent plus de δ -endotoxines ou d'autres facteurs de virulence agissant ou non en synergie avec la spore. Plutôt qu'une spore sur mille puisse provoquer une septicémie, peut-être qu'une spore sur cent est en mesure de le faire.	
Fonctionnalités des CPI	Cristallisation complète	Il a été mentionné dans la section 2.1.2 que la maturation complète des spores favorise la cristallisation complète des CPI. Le prolongement de la cristallisation des CPI ou de la vie des ARNm utilisés pour fabriquer les diverses composantes des CPI contribueraient aussi à leur cristallisation complète en permettant de traduire la quantité adéquate de protéines. En comparaison avec les CPI incomplets, des CPI complets ont une stabilité accrue et leurs fonctionnalités insecticides sont maximales. Si cette hypothèse prime sur les autres, les CPI produits dans les boues auraient un pouvoir insecticide plus élevé.
	Surexpression des gènes <i>cry</i>	Les boues pourraient stimuler l'expression des gènes <i>cry</i> (ou autres séquences entomotoxiques) sur le plasmide ou le chromosome bactérien. La surexpression des séquences générales sur les plasmides, provoquant du même coup une surexpression des gènes <i>cry</i> localisés à proximité, est plausible. Il est possible aussi qu'il y ait une sélection de cellules contenant plusieurs plasmides, un nombre plus élevé de gènes <i>cry</i> par plasmide (ex. : plusieurs gènes <i>cryI</i> ou différents types de <i>cryI</i>) et/ou des promoteurs BtI et BtII plus vigoureux. Ces possibilités pourraient ainsi augmenter la quantité de CPI et leur pouvoir insecticide s'ils contiennent un plus grand pourcentage de delta-endotoxines (plus de 7%) et/ou des séquences d'acides aminés spécifiques à d'autres récepteurs cellulaires. Comme il a été mentionné précédemment, les boues peuvent prolonger la cristallisation des CPI ou la vie des ARNm utilisés pour fabriquer les diverses composantes des CPI. Cela pourrait permettre de traduire une plus grande quantité de delta-endotoxines qui seraient ensuite intégrées dans les CPI. Il est possible aussi que, durant la compétition des cellules végétatives pour les nutriments, les boues favorisent l'émergence des cellules bactériennes ayant un niveau d'expression des gènes <i>cry</i> naturellement élevés ou d'autres gènes associés à la production de facteurs de virulence.
	Autres	Si les caractéristiques des CPI sont différentes dans les boues (contenu en delta-endotoxine, forme et taille des cristaux...), leurs fonctionnalités peuvent être accrues au niveau du système intestinal de l'insecte, soit en termes de solubilité du cristal, de conversion protoxine-toxines, de liaison aux récepteurs épithéliales des cellules et de formation de pores. De façon globale, la spécificité peut varier et l'entomotoxicité augmente, diminue ou reste inchangée. Les boues semblent modifier la spécificité des CPI pour le bénéfice de l'entomotoxicité.
Facteurs de virulence autres que les CPI et les spores	Il est possible aussi que les autres métabolites secondaires insecticides formés soient surproduits (PIV, exotoxines, autres protéines insecticides inconnues...) ou plus performants en terme d'entomotoxicité (protéases alcalines, chitinases...). Ces métabolites secondaires sont présents dans la phase soluble du bouillon fermenté. Les ratios élevés de <i>Tx/prot.solubles</i> suggèrent que les protéines solubles aient un très fort pouvoir insecticide. Cette hypothèse est discutée dans les sections 6.3.2.2 et 7.3.1.1.	
Synergie entre les facteurs de virulence	Les nouvelles fonctionnalités des facteurs de virulence influencent peut-être leur synergie lors de l'activité insecticide. Par exemple, des chitinases plus performantes pourraient endommager davantage les cellules intestinales de la larve et les rendre plus vulnérables à l'action des δ -endotoxines.	

Malgré les conditions en fiole Erlenmeyer défavorables à la production de protéases, l'activité protéolytique est plus élevée dans les BEM non hydrolysées et hydrolysées par rapport au milieu soja. Cette observation s'explique par la complexité des composés azotés qui induit la production de protéases (Tan et Donavan, 2000 ; Zouari et Jaoua, 1999). Le rapport *Act.proteo./prot.solubles* est particulièrement plus élevée avec le traitement thermo-oxydant (TOM). Cela suggère que les protéases alcalines produites soient plus actives en terme d'activité protéolytique. Cette possibilité est discutée plus en profondeur dans la sous-section 6.3.2.2.5. L'activité protéolytique des protéases dans les BEM est aussi plus élevée que celle observée dans les BES. Les composés azotés sont plus complexes dans les BEM que dans les BES, ce qui exige un plus grand effort enzymatique et stimule ainsi la production de protéases.

L'activité protéolytique est plus faible dans les BES par rapport au milieu soja, sauf pour le traitement thermo-oxydant (TOS). L'application d'une oxydation partielle à des boues hydrolysées augmente les teneurs de carbone organique, de protéines et de divers éléments inorganiques (Mn, Cu, Ca, S et Mg) dans la phase soluble qui sont des éléments importants pour la formation de métabolites secondaires. Les conditions de culture du traitement thermo-oxydant des BES semblent également favoriser la production de protéases plus actives en terme d'activité protéolytique puisque qu'un fort ratio *Act.proteo./prot.solubles* est observé.

Les protéines mesurées dans les bouillons fermentés incluent non seulement des protéines produites par Btk HD-1, mais aussi les protéines résiduelles des boues en phase soluble. Les protéines résiduelles sont susceptibles aux attaques des protéases de Btk HD-1 et représentent peut-être une faible partie des protéines solubles détectées. Dans ce travail, l'interprétation des ratios *Tx/prot.solubles* et *Act.proteo./prot.solubles* prend en considération leur présence. Le ratio *Act.proteo./prot.solubles* considère aussi les autres protéines solubles autres que les protéases. Il n'est pas possible de déterminer le pourcentage de protéases dans l'ensemble des protéines solubles. Il est cependant possible qu'il y ait peu de protéases et autant d'activité protéolytique. Ceci soutiendrait davantage l'hypothèse que les protéases soient plus fonctionnelles dans les boues.

Les protéases présentes dans le bouillon fermenté peuvent s'attaquer aux CPI au cours de la fermentation, particulièrement si le pH n'est pas contrôlé. C'est le cas en fiole Erlenmeyer. Il n'est pas possible pour l'instant de déterminer l'impact de ce phénomène sur les entomotoxicités observées. L'absence de contrôle de pH peut également susciter des réactions de glycosylation non enzymatique au niveau des CPI (voir section 2.1.3.3). Ces réactions pourraient être plus prononcées en raison de la présence de sucres dans les PEC résiduels des boues ou des débris cellulaires.

Comme la glycolysation non enzymatique dépend de la composition du milieu, elle peut expliquer les variations des entomotoxicités d'un substrat à l'autre observées dans le Tableau 30.

En appliquant les conditions optimales des traitements, les entomotoxicités observées se situent au niveau des valeurs prédites par les modèles mathématiques dans trois cas sur cinq (TAM, TAS et TOS). Pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM (TAM), le modèle était suffisant précis ($R^2=0,90$) pour prédire la valeur juste. Pour les traitements thermo-alkalin et thermo-oxydant des BES (TAS et TOS), les modèles sont parvenus à prédire les valeurs observées malgré des coefficients de détermination inférieurs (0,37 et 0,54). Ces modèles peuvent être utilisés pour prédire l'entomotoxicité de Btk HD-1 dans des boues ayant subies ces traitements.

Les valeurs expérimentales diffèrent de 26% et 15% par rapport aux valeurs prédites dans le cas de l'hydrolyse alcaline des BES (ALS) et du traitement thermo-oxydant des BEM (TOM) respectivement. Les modèles n'ont pas réussi à prédire avec précision les valeurs. Les conditions optimales de ces deux traitements n'ont pas été bien cernées par la MRS.

En résumé, les conditions optimales ont été vérifiées en fioles Erlenmeyer avec succès dans le cas de l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM ainsi que des traitements thermo-alkalin et thermo-oxydant de BES. La comparaison avec le milieu soja et l'ajout des mesures du contenu en protéines et de l'activité protéolytique ajoutent des éléments de discussion intéressants. Les boues hydrolysées et non hydrolysées sont un milieu stimulant pour la production de spores plus performantes ou de métabolites secondaires insecticides en grande quantité et/ou plus actifs comme en témoignent les ratios *Tx/spores*, *Tx/prot.solubles* et *Act.proteo./prot.solubles* très élevés dans plusieurs cas. Le contenu en protéines est plus faible dans les boues après 48h de fermentation. En considérant qu'une partie de ces protéines seraient entomotoxiques, elles ont un pouvoir insecticide plus grand compte tenu des fortes entomotoxicités observées. De plus, les BEM ont la particularité de stimuler la production de protéases malgré les conditions défavorables de pH et d'aération.

6.3.2 Essais en fermenteur

L'un des objectifs de ce travail consiste à tester les traitements optimisés en bioréacteur de 15 litres permettant de contrôler le pH et l'aération, deux paramètres importants pour la production de Btk HD-1. Tous les traitements sur les BES ont été testés en fermenteur selon leurs conditions optimales respectives. Aucune expérience n'a été réalisée avec les BEM dans les fermenteurs en raison de la présence de grains siliceux dans ce type de boue. Les grains siliceux peuvent interférer avec les sondes analytiques et sont susceptibles de briser l'équipement de fermentation. Deux

paramètres supplémentaires ont été mesurés, il s'agit du taux de croissance spécifique (μ) et du coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène ($k_L a$). Les résultats sont comparés avec le milieu conventionnel à base de soja.

6.3.2.1 Résultats

Les valeurs des principaux paramètres expérimentaux après 48h de fermentation sont compilées dans le Tableau 32.

Tableau 32 Validation des conditions optimales des traitements sur les boues secondaires (BES) en fermenteur (volume total de 15 litres, volume de travail de 10 litres). Résultats après 48h. Comparaison avec les boues secondaires non traitées et le milieu synthétique à base de soja.

Substrat	Traitement	Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)		Cellules viables (UFCx10 ⁷ /ml)		Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)		Entomotox. (UIx10 ³ /µl)		Sporul. %	μ (h ⁻¹)	Act. proteo. (UI/ml)		$k_L a$ max. (h ⁻¹)	Contenu en prot. solubles (mg/ml)	
		Valeur	Diff. (%) ¹	Valeur	Diff. (%) ¹	Valeur	Diff. (%) ¹	Valeur	Diff. (%) ¹			Valeur	Diff. (%) ¹		Valeur	Diff. (%) ¹
Soja	Aucun	66,0		0		66,0		6,5		100,0	0,51	3,02		283,9	5,10	
BES	Aucun (contrôle, 25 g MES/l) ²	50,0		20,0		30,0		12,7		60,0	0,23	0,98		122,5	0,82	
	Alcalin (ALS, 37 g MES/l)	51,0	2,0	6,7	-66,5	44,3	47,7	17,4	37	86,9	0,25	0,72	-26,5	162,9	0,79	-3,7
	Thermo-alcalin (TAS, 30 g MES/l)	39,7	-20,6	0,3	-98,5	39,3	31,0	19,0	49	99,0	0,43	0,52	-46,9	249,2	0,80	-2,4
	Thermo-oxydant (TOS, 36,4 g MES/l)	49,0	-2,0	17,0	-15,0	32,0	6,7	17,9	40	65,3	0,69	1,24	26,5	230,0	0,62	-24,4

¹ Écart relatif des valeurs avec celles des BES non traitées (calculé avec les données brutes).

² Un contrôle négatif a été effectuée avec les boues utilisées dans cette expérience (BES8). Les boues étaient stériles et ajustées à 25 g MES/l. Lors du bioessai, le pourcentage de mortalité chez 25 individus (larves de *C. occidentalis*) observé avec un échantillon de BES8 non dilué était de 4%, soit un pourcentage équivalent à celui du témoin (4%).

Btk HD-1 atteint de meilleurs rendements en cellules et spores viables, en sporulation et en activité protéolytique dans le milieu soja par rapport aux fermentations des BES non traitées ou traitées. Cependant, l'entomotoxicité est faible ($6,5 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$)⁹⁰. Cette dernière augmente considérablement lorsque Btk HD-1 est cultivée dans des boues traitées.

⁹⁰ En comparaison avec Tyagi et al. (2002), selon les mêmes conditions de culture dans le milieu soja (fermenteur de 15 litres, souche Btk HD-1), l'entomotoxicité observée dans ce travail est légèrement plus faible ($6,5 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$ vis-à-vis $7,9 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$). Les auteurs ont aussi reporté une activité protéolytique plus faible après 48h, soit environ 1,00 UI/ml. Les plus fortes activités protéolytiques avaient été observées après 9h et 24h (approximativement 3,00 UI/ml).

Selon les tableaux 31 et 32, les entomotoxicités obtenues en fermenteur après la fermentation de boues ayant subies une hydrolyse alcaline ($17,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) ou thermo-alcaline ($19,0 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) sont supérieures à celles observées en fioles Erlenmeyer ($14,9 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$ et $16,4 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$). Les entomotoxicités du traitement thermo-oxydant obtenues en fiole ($17,7 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) et en bioréacteur ($17,9 \times 10^3 \text{UI}/\mu\text{l}$) sont similaires.

Selon le Tableau 32, de forts taux de sporulation ont été atteints dans les boues ayant subies une hydrolyse alcaline ou thermo-alcaline. D'ailleurs, presque 100% des cellules ont sporulé dans les boues ayant subies une hydrolyse thermo-alcaline.

De meilleurs taux de croissance sont observés dans les boues traitées et un taux supérieur à celui du milieu soja est obtenu avec le traitement thermo-oxydant.

Les valeurs de $k_1 a$ maximales obtenues sont très élevées dans le milieu soja ($289,3 \text{ h}^{-1}$) et les boues hydrolysées (de $230,0$ à $248,3 \text{ h}^{-1}$) en comparaison avec le contrôle ($122,5 \text{ h}^{-1}$).

Les ratios $Tx/spores$, $Tx/prot.solubles$, et $Act.proteo./prot.solubles$ sont présentés dans le Tableau 33. Tous les ratios sont plus élevés dans les boues que dans le milieu soja. Le ratio $Tx/spores$ est plus élevé dans les boues ayant subies une hydrolyse thermo-alcaline et un traitement thermo-oxydant. Le ratio $Tx/prot.solubles$ est plus élevé dans les boues hydrolysées que celui du contrôle. Seul le ratio $Act.proteo./prot.solubles$ du traitement thermo-oxydant est plus élevé que celui du contrôle.

Tableau 33 Entomotoxicité et activité protéolytique spécifiques de Btk HD-1 dans le milieu conventionnel à base de soja et dans les boues secondaires traitées et non traitées.

Substrat	Traitement	Entomotoxicité spécifique		Activité protéolytique spécifique <i>Act.proteo./prot.solubles</i> (UI/mg)
		<i>Tx/spores</i> (UI/ 1×10^5 spores)	<i>Tx/prot.solubles</i> (UI/mg)	
Soja	Aucun	0,010	1,27	0,59
BES	Aucun (contrôle)	0,042	15,51	1,20
	Alcalin (ALS)	0,039	22,06	0,91
	Thermo-alcalin (TAS)	0,048	23,70	0,65
	Thermo-oxydant (TOS)	0,056	28,78	2,00

La croissance cellulaire au cours de la fermentation est illustrée à la Figure 22. Normalement, une courbe de croissance contient une phase d'adaptation, une phase exponentielle, une phase stationnaire et une phase de déclin (Pelzcar, 1993). Aucune phase d'adaptation n'est observée au début de la fermentation dans tous les cas. Cela indique que les précultures de départ étaient bien

acclimatées au milieu de culture. La pente abrupte de la phase exponentielle de croissance de Btk HD-1 est de courte durée avec le traitement thermo-oxydant et l'hydrolyse thermo-alkaline. La phase exponentielle se termine entre 6h et 9h après l'inoculation pour faire place à la phase stationnaire. Pour le milieu soja, la fin de la phase exponentielle de croissance est observée entre 12h et 15h. Quant au contrôle et à l'hydrolyse alcaline, sa phase exponentielle se termine entre 15h et 18h. Dans le contrôle et le traitement oxydant, la phase stationnaire se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience avec de légères fluctuations. Les fluctuations du nombre de cellules durant la phase stationnaire sont plus importantes pour le milieu soja, l'hydrolyse alcaline et l'hydrolyse thermo-alkaline. Pour le milieu soja, la phase de déclin est observée entre 33h et 36h et presque 100% des cellules ont sporulé après 48h de fermentation. La diminution du nombre de cellules pour l'hydrolyse thermo-alkaline après 27h suggère le début d'une phase de déclin.

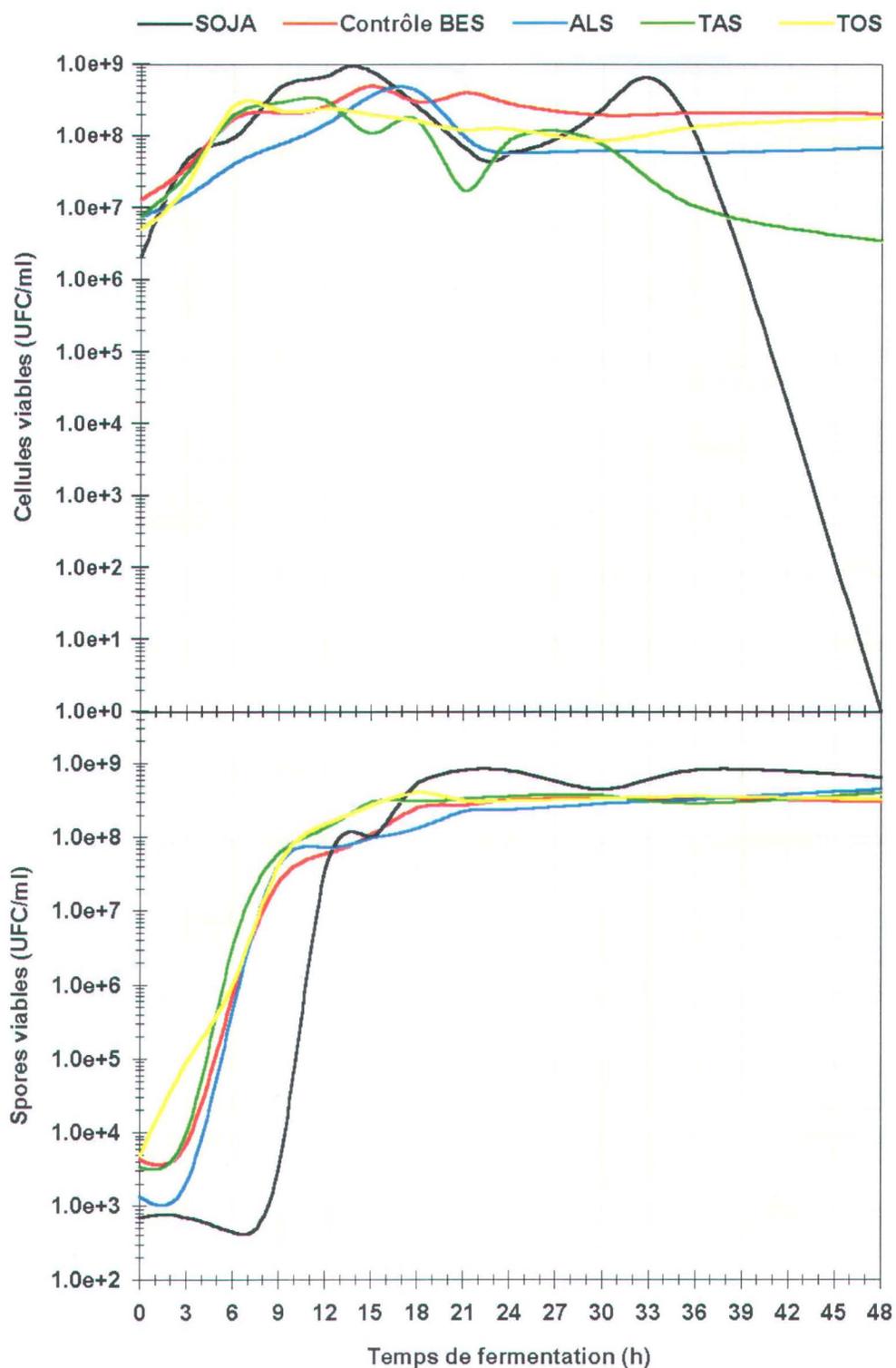


Figure 22

Profils de la croissance cellulaire et de la sporulation de Btk HD-1 au cours de la fermentation de BES non traitées (Contrôle BES), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et de milieu synthétique conventionnel pour la production de Bt (SOJA).

Le plus fort taux de croissance spécifique est obtenu avec le traitement thermo-oxydant, soit une valeur de $0,69 \text{ h}^{-1}$. L'hydrolyse thermo-alkaline permet d'obtenir un taux de croissance spécifique supérieur au contrôle ($0,43 \text{ h}^{-1}$ vis-à-vis $0,23 \text{ h}^{-1}$), mais inférieur au milieu soja ($0,51 \text{ h}^{-1}$). L'hydrolyse alcaline donne un taux de croissance spécifique légèrement supérieur au contrôle, soit une valeur de $0,25 \text{ h}^{-1}$.

La production de spores de Btk HD-1 pendant la fermentation est aussi illustrée à la Figure 22. Dans les boues, le processus de sporulation s'enclenche prématurément entre 0h et 3h et Btk HD-1 produit graduellement des spores durant la phase de croissance. Dans le cas du contrôle, de l'hydrolyse thermo-alkaline et du traitement thermo-oxydant, la quantité de spores augmente de façon considérable lorsque la phase exponentielle ralentit son rythme. Toutefois, dans le milieu soja, le processus de sporulation s'enclenche entre 7h et 9h et s'intensifie durant la période où la phase exponentielle de croissance se termine (entre 9h et 15h). Après 21h de fermentation, le nombre de spores viables varie très peu dans tous les cas.

La Figure 23 montre les variations de l'oxygène dissous (OD) lors des fermentations. La concentration en OD diminue drastiquement entre 3h et 6h de fermentation dans le milieu soja, le contrôle et le traitement thermo-oxydant. Les diminutions de l'OD pour l'hydrolyse alcaline et l'hydrolyse thermo-alkaline sont observées sur une plus longue période (entre 6h et 12h). Ces diminutions corroborent avec la phase exponentielle de croissance (Figure 21). Des augmentations subséquentes de l'OD vers la fin de la phase exponentielle de croissance sont observées. Une fois que les bactéries sont en phase stationnaire, la concentration en OD est relativement constante jusqu'à la fin de la fermentation. Dans le cas de l'hydrolyse alcaline, une légère diminution survient entre 12h et 18h où la phase exponentielle de croissance se prolonge jusqu'à 18h. Dans le milieu soya, la concentration en OD descend sous le seuil critique (20%) entre 4h et 5h alors qu'elle le respecte dans les autres cas. Les pics observés sur la Figure 22 sont provoqués par l'arrêt de l'aération pour la mesure du $k_L a$. Ces pics apparaissent sur le graphique parce que les arrêts de l'aération étaient plus longs durant la prise des données (plus de 2 min).

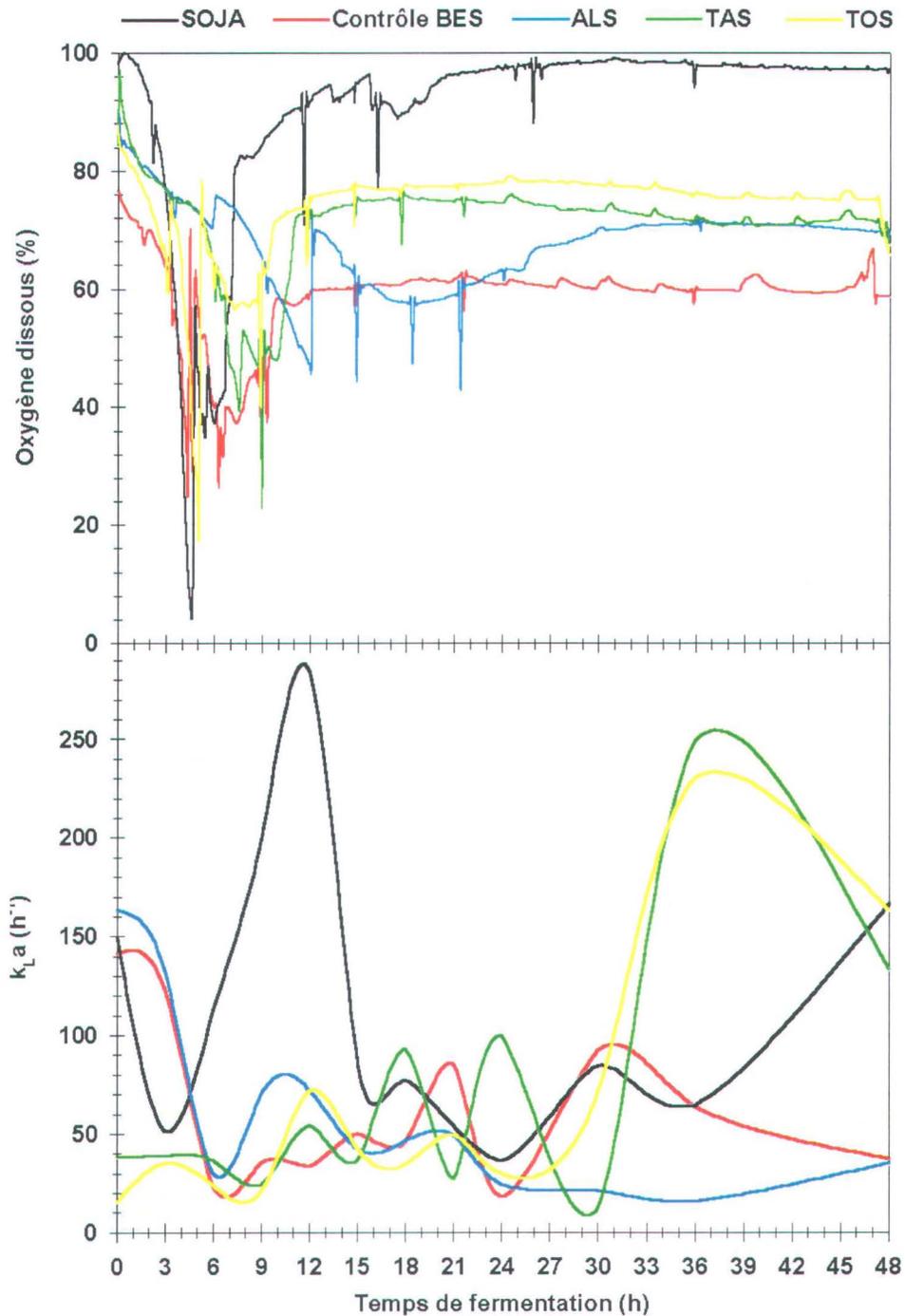


Figure 23 Suivi de l'oxygène dissous (OD) et du taux de transfert de l'oxygène ($k_L a$) au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et du milieu soja (SOJA).

La Figure 23 montre aussi le profil du $k_L a$ durant chaque expérience. Le $k_L a$ fluctue de façon irrégulière dans tous les cas. Une très forte valeur de 283,9 h^{-1} est atteinte dans le milieu soja entre 11h et 12h de fermentation. Pour l'hydrolyse alcaline et le traitement thermo-oxydant, des valeurs

maximales de $248,2 \text{ h}^{-1}$ et $230,0 \text{ h}^{-1}$ respectivement ont été observées lors de l'échantillonnage à 36h. Normalement, les valeurs maximales de k_{La} ne sont pas observées après la phase exponentielle de croissance car les besoins en oxygène des cellules végétatives en phase stationnaire sont théoriquement faibles. Selon la figure 22, le nombre de cellules viables n'augmente pas durant la phase stationnaire de croissance et cela indique que les fortes valeurs de k_{La} ne sont pas attribuées à une augmentation de la consommation de l'oxygène suite à une croissance cellulaire vigoureuse. Une erreur lors de l'analyse de la concentration en oxygène dissous durant la prise de valeur est peut-être survenue. Les particules et les matières en suspension présentes dans le milieu pourraient interférer avec l'activité de la sonde d'oxygène dissous. Par exemple, si des matières en suspension et/ou de biomasse cellulaire sont adsorbées sur la sonde, elle pourrait détecter une prise en charge de l'oxygène « ponctuelle » par les bactéries, non représentative de l'ensemble du milieu. Les boues sont un milieu de culture non newtonien dans lequel il est possible d'observer des irrégularités lors de la mesure du k_{La} (Aiba et al., 1973). Ces irrégularités sont expliquées davantage dans la section 6.3.2.2.3. Pour l'hydrolyse alcaline, les plus fortes valeurs sont observées au début de la fermentation entre 0h et 3h.

L'entomotoxicité et l'activité protéolytique de Btk HD-1 ont été déterminées après 30h, 36h et 48h de fermentation (sauf pour le milieu soja). Les résultats sont illustrés à la Figure 24. L'entomotoxicité varie peu avec le temps dans les boues non traitées. Elle augmente entre 30h et 48h avec l'hydrolyse alcaline alors qu'elle augmente entre 36h et 48h avec l'hydrolyse thermo-alcaline. Pour le traitement oxydant, elle diminue entre 30h et 36h pour ensuite remonter dans les dernières heures de fermentation. Après 48h de fermentation, toutes les entomotoxicités obtenues dans les boues (de $12,7 \times 10^3$ à $19,0 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$) sont largement supérieures au milieu soja ($6,5 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$). Des entomotoxicités supérieures à $17 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$ ont été obtenues dans les trois cas de boues traitées et elles sont supérieures à celle du contrôle ($12,7 \times 10^3 \text{ UI}/\mu\text{l}$). Les entomotoxicités maximales sont atteintes après 48h dans les boues hydrolysées. Dans le cas du contrôle, les valeurs observées à chaque temps différent peu selon l'erreur de ma méthode.

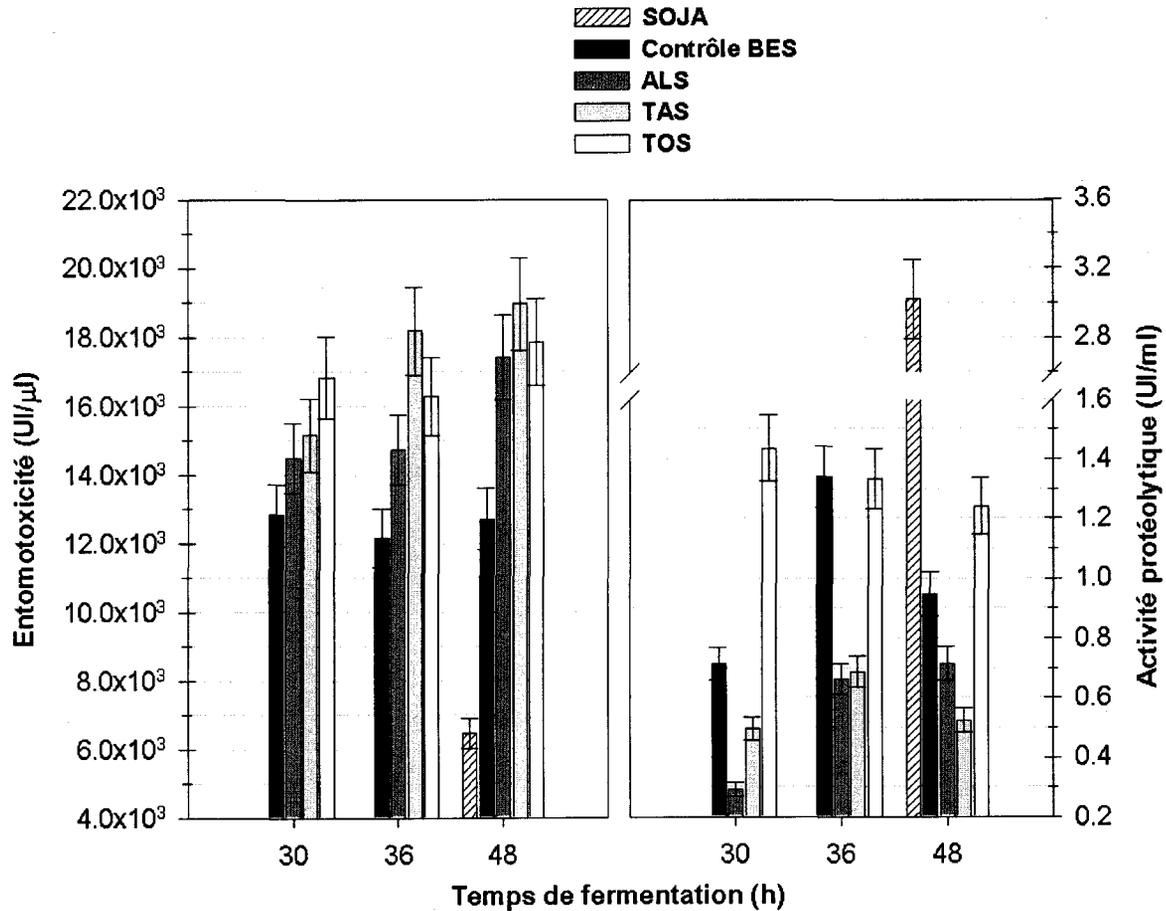


Figure 24 Entomotoxicité et activité protéolytique de Btk HD-1 après 30h, 36h et 48h de fermentation de BES non traitées (Contrôle BES, 25 g MES/l), de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant) et du milieu soja (SOJA). Les écarts types correspondent aux erreurs des méthodes, soit 7% et 7,7% pour l'entomotoxicité et l'activité protéolytique respectivement.

En ce qui concerne l'activité protéolytique (Figure 24), elle est plus forte après 36h de fermentation dans le cas du contrôle (1,34 UI/ml) et de l'hydrolyse thermo-alcaline (0,69 UI/ml). Elle augmente considérablement entre 30h et 36h pour l'hydrolyse alcaline et conserve une valeur de même ordre jusqu'à la fin de l'expérience (0,72 UI/ml). Pour le traitement thermo-oxydant, la valeur la plus élevée est observée après 30h de fermentation (1,43 UI/ml), mais elle diminue avec le temps. La meilleure activité protéolytique après 48h est observée avec le traitement thermo-oxydant (1,24 UI/ml), mais elle ne surpasse pas celle obtenue dans le milieu soja (3,02 UI/ml). La valeur observée dans le milieu soja est d'ailleurs très élevée en comparaison avec les travaux de Tyagi et al. (2002), Lamontagne (2004) et Yezza (2004) où l'activité protéolytique observée après 48h se situe entre 1,00 et 2,56 UI/ml.

Les changements de la viscosité des boues traitées et non traitées durant la fermentation sont illustrés à la Figure 25. Cette figure montre clairement que les traitements diminuent considérablement la viscosité initiale des boues. Les hausses de la viscosité entre 0h et 6h pour le traitement thermo-oxydant et entre 6h et 12h pour l'hydrolyse thermo-alkaline concordent avec l'augmentation des comptes totaux observée à la Figure 25. Leurs valeurs de viscosité diminuent avec le temps et reviennent près de leurs valeurs initiales après 48h de fermentation. Pour l'hydrolyse alcaline, la hausse de la viscosité est plutôt observée après 15h de fermentation et diminue légèrement avec le temps. Les variations observées dans les boues traitées diffèrent de celles des boues non traitées. La viscosité diminue jusqu'à 36h pour ensuite remonter après 48h. Une hausse temporaire est toutefois observée après 12h.

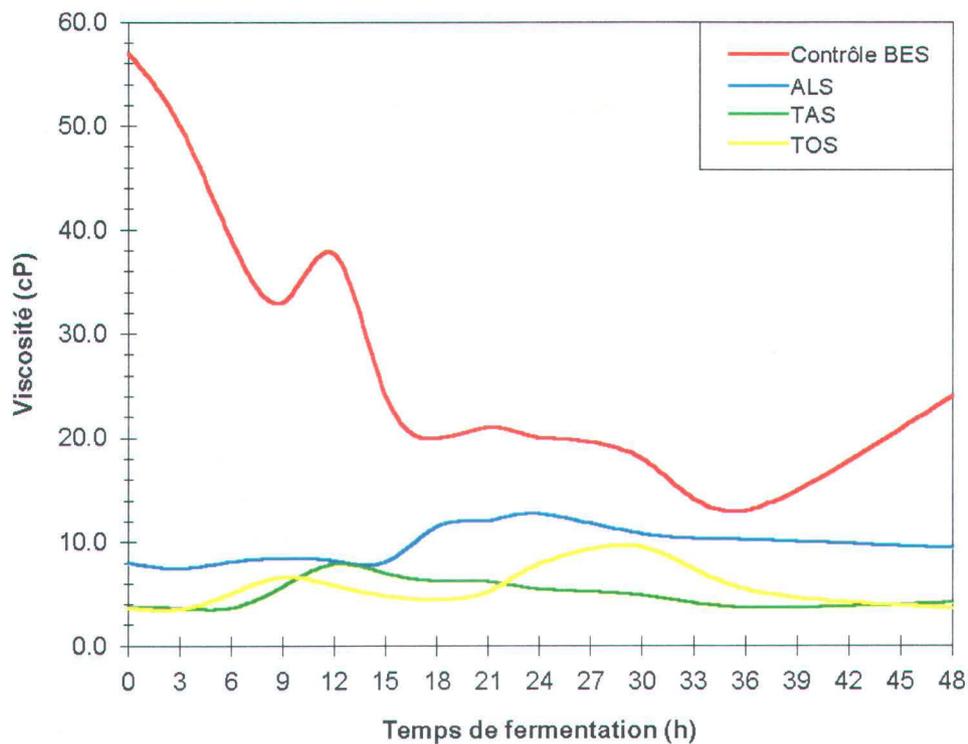


Figure 25 Suivi de la viscosité au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES) et de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alkaline ; TOS = traitement thermo-oxydant).

L'influence des traitements sur la taille initiale des particules des boues ainsi que leur modification au cours de la fermentation sont illustrées à la Figure 26. Tout d'abord, le diamètre médian (D50) des particules dans les boues secondaires non traitées ont une taille inférieure à 24,3 μm . Les traitements thermo-alkalin et thermo-oxydant diminuent considérablement la taille initiale des particules des boues : le D50 des particules est respectivement 13,8 μm et 9,0 μm à T=0. Quant à

elle, l'hydrolyse alcaline affecte peu la taille initiale des particules (22,0 μm à T=0). Le diamètre médian des particules du contrôle diminue au cours de la fermentation et atteint la plus faible valeur après 48h, soit 1,7 μm . Le diamètre médian des particules des boues traitées diminue à des valeurs se situant entre 3,3 μm et 5,4 μm après 48h. De légères fluctuations sont observées dans tous les cas.

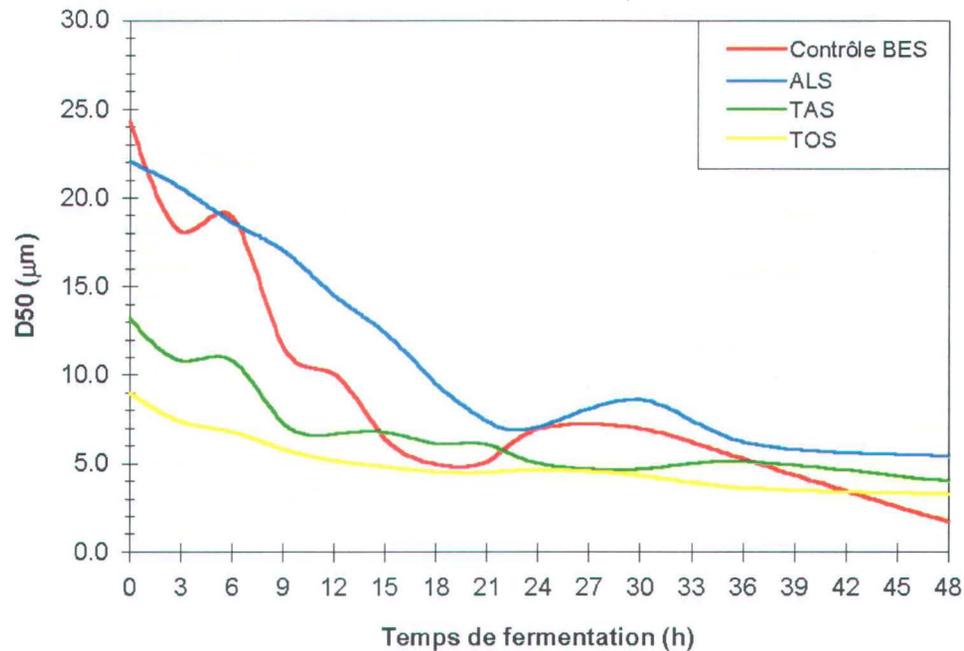


Figure 26 Suivi de la taille des particules au cours de la fermentation par Btk HD-1 de BES non traitées (Contrôle BES) et de BES traitées (ALS = hydrolyse alcaline ; TAS = hydrolyse thermo-alcaline ; TOS = traitement thermo-oxydant). D50 = diamètre médian correspondant au diamètre équivalent pour lequel la valeur de la distribution cumulée est de 50 %.

6.3.2.2 Discussion

6.3.2.2.1 Croissance cellulaire

Le milieu soja offre des conditions très favorables à la croissance de Btk HD-1 en raison de la quantité et de la disponibilité des éléments nutritifs. Le nombre maximal de cellules observé vers la fin de la phase exponentielle de croissance est supérieur dans le milieu soja ($7,87 \times 10^8$ UFC/ml) par rapport à ceux observés dans les boues (de $2,56 \times 10^8$ à $4,88 \times 10^8$ UFC/ml).

Une forte concentration maximale de cellules viables est atteinte dans les boues non traitées ($4,88 \times 10^8$ UFC/ml après 15h) et dépasse celles obtenues avec l'hydrolyse alcaline

($4,07 \times 10^8$ UFC/ml après 18h), l'hydrolyse thermo-alkaline ($3,03 \times 10^8$ UFC/ml après 12h) et le traitement thermo-oxydant ($2,56 \times 10^8$ UFC/ml après 6h). Cependant, elle ne dépasse pas celle obtenue dans le milieu soja ($7,87 \times 10^8$ UFC/ml après 15h) qui contient plus d'éléments nutritifs appropriés pour la croissance végétative. Dans les boues, la concentration en éléments nutritifs augmente avec la concentration en solides (Vidyarthi et al., 2002). Les boues traitées contiennent plus de MES que les boues non traitées. Cette quantité supplémentaire d'éléments nutritifs par rapport aux boues non traitées ne semblent pas influencer le nombre maximal de cellules produites.

Le traitement thermo-oxydant offre des conditions très favorables à la croissance végétative de Btk HD-1 avec un taux de croissance spécifique supérieur ($0,69 \text{ h}^{-1}$) à celui du milieu soja ($0,51 \text{ h}^{-1}$) et à toutes les autres expériences sur les boues (entre $0,23$ et $0,43 \text{ h}^{-1}$). Btk HD-1 a consommé plus rapidement les sources de carbone et d'azote facilement assimilables parce qu'elles étaient présentes en plus faible quantité par rapport au milieu soja. La faible quantité de ces sources de C et N est attestée avec le processus de sporulation qui s'est enclenché au cours de la première heure de fermentation. La sporulation a été entamée très rapidement parce qu'il y avait peu de sources de C et N pour réprimer le mécanisme. Malgré le taux de croissance spécifique supérieur, le nombre maximal de cellules viables obtenu ($2,56 \times 10^8$ UFC/ml) est inférieur à toutes les autres expériences avec les boues (entre $3,03 \times 10^8$ UFC/ml et $4,88 \times 10^8$ UFC/ml).

En comparaison avec les boues non traitées, les traitements thermo-alkalin et thermo-oxydant stimulent la croissance cellulaire de Btk HD-1 et de meilleurs taux de croissance sont obtenus. La quantité élevée de sources de carbone et de protéines dissoutes favorise la croissance rapide des cellules (section 5.3). Les bactéries ont besoin de synthétiser une panoplie d'enzymes pour assimiler les sources de C et de N des boues non traitées. Ces sources sont biodégradées lentement et il peut y avoir une disponibilité limitée des éléments nutritifs supportant la croissance végétative (Vidyarthi et al., 2002).

Une croissance lente a été observée avec l'hydrolyse alcaline ($\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$). Vidyarthi et al. (2002) suggèrent qu'une croissance lente aide les spores à devenir mature et fournit suffisamment de temps pour la formation des delta-endotoxines avant que la cellule se lyse. Les spores matures et les CPI potentiellement plus complets (et/ou performants) jouent possiblement un rôle important dans la forte entomotoxicité (voir section 6.3.1.2). La possibilité que les spores soient plus matures (et toxiques) s'appliquent également au contrôle dans lequel une croissance lente est observée ($\mu = 0,23 \text{ h}^{-1}$). L'hydrolyse alcaline et le contrôle ont d'ailleurs des ratios *Tx/spores* similaires

(Tableau 33). Toutefois, les spores matures ne semblent pas avoir le même impact sur l'entomotoxicité observée dans le contrôle.

Les taux de croissance spécifique inférieurs dans le contrôle, l'hydrolyse alcaline et l'hydrolyse thermo-alcaline par rapport au milieu soja peuvent contribuer à l'entomotoxicité d'une autre façon. Selon Farrera et al. (1998), le taux de croissance peut influencer le contenu des plasmides. Les conditions de croissance plus difficiles dans les boues favoriseraient la sélection de bactéries dont les plasmides contiendraient une plus grande quantité de gènes *cry* ou la sélection de cellules contenant plusieurs copies de plasmide (voir section 6.3.1.2).

Un phénomène de **diauxie** est observé dans le contrôle entre 9h et 12h de fermentation, mais pas dans les boues traitées. Les traitements parviennent à simplifier les sources de C et N qui autrement seraient dégradées en molécules plus simples par voie enzymatique, ce qui atténue le phénomène de diauxie. Dans le cas de l'hydrolyse thermo-alcaline et du traitement thermo-oxydant, l'atténuation de ce phénomène permet au processus de sporulation de s'enclencher plus tôt car les sources de C et N répressives sont rapidement dégradées.

Pour tous les substrats, le nombre initial de cellules était très élevé (entre $2,0 \times 10^6$ et $1,5 \times 10^7$ UFC/ml). Il est souhaitable d'entamer une fermentation avec une concentration initiale de cellules variant entre 1×10^5 et 1×10^6 UFC/ml (Gerhardt et Drew, 1993). Lorsque que la concentration initiale est supérieure à 1×10^6 cellules/ml, les bactéries entrent en compétition pour les éléments nutritifs facilement accessibles du milieu. Ce comportement diminue le temps de génération des bactéries et leur taux de croissance. Les faibles taux de croissance du contrôle, de l'hydrolyse alcaline et l'hydrolyse thermo-alcaline (par rapport au milieu soja et au traitement thermo-oxydant) seraient peut-être expliqués par leur forte concentration initiale en cellules ($1,3 \times 10^7$, $7,5 \times 10^6$ et $7,3 \times 10^6$ cellules/ml respectivement).

6.3.2.2.2 Sporulation

Dans le milieu soja, le processus de sporulation s'entame vers la fin de la phase exponentielle de croissance. Btk HD-1 utilise pour sa croissance végétative les sources de C et N susceptibles de réprimer la sporulation. Une fois qu'elles ont été utilisées, la sporulation commence et s'intensifie dans les heures qui suivent. La courte durée (environ 15h) et le fort pourcentage de sporulation après 48h (100%) indiquent que le processus de production de spores a fonctionné plus efficacement dans le milieu soja vis-à-vis les boues. La faible entomotoxicité peut toutefois être attribuée à cette forte sporulation. Selon Vidyarthi et al. (2002), un mécanisme de sporulation très

intense consomme une forte quantité d'éléments qui étaient destinés à la production des CPI et d'autres facteurs de virulence. De plus, les auteurs suggèrent que les spores n'aient pas atteint leur pleine maturité suite à une sporulation rapide. La faible maturation des spores aurait alors une influence sur la formation des CPI. Leur taille et leur forme pourraient être différentes, ce qui affecterait leur pouvoir insecticide. Une spore immature suggère aussi qu'elle soit moins fonctionnelle en terme d'activité insecticide. Elle pourrait contenir moins de DPA dans son cortex. Elle serait alors moins résistante et plus vulnérable à des facteurs susceptibles de causer sa mort avant d'être ingérée par l'insecte ou provoquer une septicémie. Il est possible aussi que la lyse cellulaire ait survécu avant que la bactérie incorpore un grand nombre de facteurs de virulence (ex. : delta-endotoxines) dans les couches protéiques de la spore.

L'activation prématurée de la sporulation est observée dans les boues non hydrolysées et hydrolysées, particulièrement avec le traitement thermo-oxydant où le processus débute entre 0h et 3h. Les boues créent des conditions où la croissance végétative et la sporulation sont désynchronisées. Les sources de C et N responsables de la répression catabolique de la sporulation sont rapidement assimilées par Btk HD-1. Bien que ces sources de C et N soient nécessaires pour la croissance végétative, d'autres sources de C et N sont libérées par voie enzymatique et aussitôt dégradées par Btk HD-1. Ces sources supportaient la croissance végétative sans interférer avec le processus de sporulation. Selon Ferrera et al. (1998), cet effet de désynchronisation chez Bt est observé lorsque la concentration en solides est élevée dans le milieu de fermentation. Les boues sont beaucoup plus concentrées en MES que le milieu soja dans lequel les composants sont dissous. Ferrara et al. (1998) affirment que l'excès d'acides aminés, causé par une forte concentration en solides, serait responsable de la désynchronisation de la sporulation. Le contenu en acides aminés n'a pas été analysé dans ce travail. Les acides aminés jouent un rôle important dans la sporulation et la formation de CPI. Il serait intéressant de les analyser dans les boues lors de travaux ultérieurs⁹¹.

L'activation prématurée de la sporulation au début de la fermentation des boues prolonge le processus de plusieurs heures par rapport au milieu soja. Le prolongement de l'une ou plusieurs phases de la sporulation a une influence sur la maturité des spores et leur contenu en facteurs de virulence ainsi que la production de CPI. Le prolongement du processus de sporulation suggère que

⁹¹ Il est possible aussi que, dans les boues d'épuration, les cellules sporulantes atteignent plus rapidement le nombre critique où elles communiquent alors aux autres cellules, via des médiateurs chimiques, le besoin de sporuler. Les cellules sporulantes augmenteraient alors à un rythme accéléré. Ce phénomène nommé « quorum-sensing » est de plus en plus étudié chez les bactéries et peut expliquer les changements dans leur comportement vis-à-vis les conditions environnementales (Whitehead et al., 2001 ; Daniel et al., 2004).

les spores disposent de plus de temps pour atteindre leur maturité et intégrer dans leur couche sporale une plus grande quantité de delta-endotoxines ou autres facteurs de virulence. Par exemple, si la cinquième phase de la sporulation est prolongée, la bactérie pourrait incorporer davantage de facteurs de virulence dans les couches protéiques de la spore. Ou encore, si la sixième phase se prolonge, la spore atteindrait sa pleine maturité pour être apte à conserver sa viabilité avant et après son ingestion par la larve, et provoquer ensuite une septicémie. Finalement, si les étapes 3 à 5 de la sporulation durant lesquelles le processus de formation des cristaux est à son maximum d'activité, cela favoriserait la production d'un CPI entier dont le potentiel insecticide serait au meilleur de sa capacité. La figure 22 montre que la diminution du nombre de cellules viables vers la fin de la fermentation, attribuable à la lyse cellulaire, est plus faible dans les boues que dans le milieu soja. Cela suggère que les cellules sporulantes conservent plus longtemps leur spore et que l'une ou plusieurs des phases de sporulation durent plus longtemps.

6.3.2.2.3 Coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène

Pour tous les cas étudiés, les valeurs fluctuent de façon irrégulière au cours de la fermentation à cause des changements dans l'agitation et le débit d'air. Ce phénomène a déjà été observé par Yezza et al. (2004) lors de la croissance de Btk HD-1 dans les boues secondaires de la Ville de Québec. Dans ce travail, l'agitation et le débit d'air pouvaient varier entre 300 et 600 tours/min et 2 et 7 litres d'air/min durant la fermentation. Le changement de la vitesse d'agitation et du débit d'air était une façon d'assurer une concentration en oxygène dissous de 20% en tout temps. Les hausses de la vitesse d'agitation améliorent la dispersion des gaz et augmentent de cette façon le transfert de l'oxygène. Deux autres sources de variation sont la concentration en cellules viables (et en PEC) ainsi que la viscosité. Ces paramètres influencent les propriétés physiques de l'interface gaz-liquide durant la fermentation et par conséquent le k_La . Toutefois, les figures 21 et 24 indiquent qu'elles varient très peu durant la période où le k_La fluctue de façon irrégulière (de 15h jusqu'à la fin de la fermentation). Selon Aiba et al. (1973), les irrégularités dans le comportement du k_La surviennent en fonction des propriétés rhéologiques, physico-chimiques et biologiques du milieu de culture. Dans le cas des boues fermentées, la viscosité, la présence de MES et d'agent anti-mousse, la quantité de cellules viables et de PEC pourraient avoir contribué aux irrégularités du k_La .

Normalement, le k_La augmente lors de la phase exponentielle de croissance où les cellules bactériennes consomment beaucoup d'oxygène pour fournir de l'énergie à leur métabolisme. Dans les boues ayant subies une hydrolyse thermo-alkaline et un pré-traitement thermo-oxydant, les valeurs maximales de k_La sont obtenues plus tard au cours de la fermentation. Il n'est pas possible

pour l'instant de fournir des explications autres que la quantité de MES ou d'anti-mousse pouvant contribuer à cette irrégularité.

6.3.2.2.4 Entomotoxicité

L'entomotoxicité de Bt dans les boues (traitées ou non) est nettement supérieure à celle observée dans le milieu soja. La faible entomotoxicité du milieu soja pourrait s'expliquer par la protéolyse prématurée des CPI avant la fin de la fermentation. L'activité protéolytique est d'ailleurs plus élevée après 48h (3,02 UI/ml) en comparaison avec les boues fermentées (<1,24 UI/ml). Bien que le pH soit contrôlé durant la fermentation, des métalloprotéases actives à pH 7 peuvent être produites ou libérées après la lyse cellulaire (survenant lors de la phase stationnaire de croissance et la phase de déclin). Les travaux de Lamontagne (2004) démontrent effectivement que Btk HD-1 produit majoritairement des métalloprotéases dans le milieu soja sous les mêmes conditions de culture (souche, fermenteur de 15 litres...). D'ailleurs, toutes les cellules ont sporulé dans le milieu soja après 48h (Tableau 32) et une phase de déclin dans le nombre de cellules viables a été observée. Cela suggère que la lyse cellulaire était plus importante dans le milieu soja que dans les boues. Les hypothèses énumérées dans le Tableau 31 peuvent également expliquer la faible entomotoxicité observée dans le milieu soja.

Les entomotoxicités spécifiques plus élevées dans les boues que dans le milieu soja (Tableau 33) suggèrent que les spores et les autres facteurs de virulence de Btk HD-1 (cristaux, PIV, protéases, chitinases, antibiotiques...) aient un pouvoir insecticide plus important. Si cela est le cas, les nouvelles fonctionnalités pourraient varier selon le milieu de culture (soja, boues traitées...). De plus, les spores semblent moins toxiques avec l'expérience ALS alors que les protéines insecticides en phase soluble semblent plus entomotoxiques avec l'expérience TOS (ou plus nombreuses parmi les protéines solubles détectées). Dans le cas particulier des boues, les nouvelles fonctionnalités pourraient varier selon le type de traitement.

À l'exception du milieu soja, les entomotoxicités observées en fermenteur (Tableau 32) sont supérieures à celles en fiole Erlenmeyer (Tableau 30). Le contrôle du pH et l'aération en fermenteur favorisent la production de spores et de CPI et expliquent les meilleures entomotoxicités (Vidyarthi et al., 2002). Dans le cas du milieu soja, une valeur de $6,9 \times 10^3$ UI/ μ l a été observée en fiole alors qu'une valeur de $6,5 \times 10^3$ UI/ μ l a été obtenue en fermenteur. Cette observation est peu commune car une augmentation de l'entomotoxicité est attendue lors du passage des fioles Erlenmeyer au bioréacteur. Comme il a été mentionné précédemment, les protéases présentes dans le bouillon fermenté peuvent avoir prématurément protéolysées les CPI ou

autres facteurs de virulence protéiques. Si c'était le cas, ce phénomène aurait eu un impact négatif sur l'entomotoxicité.

Les entomotoxicités maximales sont détectées à des temps différents lors de la fermentation des boues traitées (48h pour ALS et TAS, 36h pour TOS) ou non traitées (30h). Les caractéristiques du milieu de fermentation peuvent retardés, désynchronisés et prolongés les processus de la sporulation et de formation des cristaux. Les CPI, les spores et/ou d'autres produits microbiens plus fonctionnels en terme d'entomotoxicité peuvent être présents dans le bouillon fermenté aux temps échantillonnés. Il est possible aussi que les protéases extracellulaires, produites par Bt durant la croissance et la sporulation, et des protéases intracellulaires, libérées dans le milieu suite à la lyse des cellules, aient protéolysé des cristaux ou autres facteurs de virulence de nature protéique à la fin de la fermentation. Les travaux de Lamontagne (2004) démontrent que Btk HD-1 produit majoritairement des métalloprotéases actives à pH 7 dans les mêmes boues utilisées pour le présent travail. Les activités protéolytiques maximales surviennent à des temps différents de l'entomotoxicité maximale pour le contrôle (36h), TAS (36h) et TOS (30h). Cela suggère que les protéases aient protéolysé des facteurs de virulence protéiques et diminué l'entomotoxicité à 36h pour le contrôle et l'expérience TAS, et à 30h pour l'expérience TOS.

Il est intéressant de constater que l'activité protéolytique et l'entomotoxicité maximales de l'expérience ALS sont détectées après 48h de fermentation. Dans ce cas-ci, le phénomène de la protéolyse prématurée semble avoir peu d'effet. Les CPI de ALS sont peut-être plus résistants à l'activité des protéases. Il pourrait y avoir un plus grand nombre de réactions de glycosylation non enzymatique qui recouvriraient de sucres les régions vulnérables des CPI contre l'attaque des protéases bactériennes. Cependant, le contrôle du pH atténue ce type de réaction chimique. Les protéases produites lors de l'expérience ALS ont possiblement de nouvelles fonctionnalités comme le suggère son ratio *act.proteo./prot.solubles*. Il est plus élevé que le milieu soja et inférieur au contrôle. Les protéases dans l'expérience ALS ont des caractéristiques différentes qui diminueraient leur activité enzymatique sur les facteurs de virulence protéiques comme les CPI. Dans cette expérience, il est possible que le processus de formation des CPI des facteurs de virulence protéiques ait été prolongé car la production de spores s'est poursuivie entre 30h et 48h, passant de $2,8 \times 10^8$ à $4,4 \times 10^8$ spores/ml. Si c'était le cas, il y avait plus des facteurs de virulence protéiques au moment où l'entomotoxicité maximale a été mesurée (48h). Si l'expérience ALS avait été prolongée, l'action des protéases sur les facteurs de virulence protéiques serait possiblement survenue plus tard dans la fermentation car l'activité protéolytique augmentait graduellement à partir de 30h.

En somme, le devenir des facteurs de virulence comme les CPI est encore incertain durant la fermentation des boues d'épuration. Il serait souhaitable de connaître le ou les facteurs de virulence dominants produits par Btk HD-1 dans les boues afin de comprendre les baisses ou les hausses d'entomotoxicité durant la phase stationnaire de croissance. Une première piste serait d'évaluer leur niveau de résistance vis-à-vis l'activité protéolytique des métalloprotéases et des protéases alcalines de Btk HD-1. Les facteurs de virulence, autres que les CPI et les spores, potentiellement produits par Btk HD-1 font l'objet de discussion dans la section 5.3.1.

6.3.2.2.5 Activité protéolytique

Les activités protéolytiques obtenues en fermenteur (Tableau 32) sont supérieures à celles des expériences en fioles Erlenmeyer (Tableau 30). Cette observation s'explique avec le contrôle de l'aération et du pH en fermenteur qui sont deux facteurs clés pour la production de protéases alcalines (section 2.1.4.3).

La plus forte activité protéolytique est observée dans le milieu soja. Lors de travaux antérieurs avec le milieu soja sous les mêmes conditions (souche, fermenteur de 15 litres...), deux pics d'activité protéolytique étaient observés, le premier à la fin de la phase exponentielle de croissance (entre 6h et 12h) et le second à la fin de la fermentation, soit après 30h (Yezza, 2004), 36h (Tyagi et al., 2002) ou 48h (Lamontagne, 2004). Le premier pic est causé par la sécrétion de protéases extracellulaires pour dégrader et assimiler les sources d'azote nécessaires à la formation de spores et des cristaux ainsi qu'à la formation d'autres facteurs de virulence pour rivaliser avec les autres cellules dans le milieu. L'activité mesurée est forte car elle inclut également les protéases extracellulaires préalablement sécrétées pour la croissance cellulaire et la formation de facteurs de virulence pour la compétition cellulaire. En plus des protéases extracellulaires persistantes ou nouvellement produites, le deuxième pic est provoqué par la présence de protéases intracellulaires, libérées dans le milieu suite à la lyse cellulaire des bactéries. Dans le cas présent, la forte activité protéolytique du milieu soja correspond au deuxième pic et la valeur observée (3,02 UI/ml) diffère peu de celle de Lamontagne observée après 48h (2,56 UI/ml)⁹².

⁹² À titre d'information, Tyagi et al. (2002) ont observé le second pic à 24h (environ 3,00 UI/ml) après lequel l'activité protéolytique a diminué (environ 1,00 UI/ml entre 30h et 48h). Yezza (2004) a observé le second pic à 48h (environ 2,00 UI/ml). Lors de l'expérience de Yezza (2004), l'activité protéolytique augmentait graduellement à partir du début de la phase stationnaire de croissance. Si la fermentation s'était poursuivie, il est possible qu'une plus forte activité protéolytique soit détectée après 48h.

Le traitement thermo-oxydant des boues (TOS) crée des conditions très stimulantes pour la production de protéases en comparaison avec les autres boues. La plus forte activité protéolytique a été détectée après 30h (1,44 UI/ml). Les boues non traitées permettent également d'atteindre une forte activité protéolytique après 30h (1,34 UI/ml). La quantité de protéases produites dépend de la complexité des protéines et de la disponibilité des sources de carbone (Tan et Donovan, 2000 ; Zouari et Jouana, 1999a). Les protéines sont apparemment plus complexes (ce traitement dissout moins de protéines que les autres selon la Figure 12) et/ou les sources de carbone sont plus disponibles (ce traitement dissout moins de carbone organique que les autres selon la Figure 8). Cela pourrait expliquer les fortes activités observées dans ces boues. Dans le cas des expériences ALS et TAS, la Figure 12 indique que ces traitements simplifient les protéines et en solubilisent une fraction significative. Bt ne ressent pas le besoin de produire autant de protéases pour assimiler ces sources d'azote. Cela expliquerait peut-être les activités protéolytiques inférieures à celles de l'expérience ALS et du contrôle. Il est possible aussi que les protéases bactériennes produites dans les boues (ex. : métalloprotéases) aient protéolysé prématurément des CPI et diminué l'entomotoxicité. Cette hypothèse reste à vérifier puisque l'action potentielle des métalloprotéases envers les facteurs de virulence de Btk HD-1 est très peu discutée dans la littérature.

Dans des travaux antérieurs, des suivis de l'activité protéolytique de Btk HD-1 ont été effectuées avec les boues secondaires de la Ville de Québec ajustées à 25 g MES/l (Tyagi et al., 2002 ; Lamontagne, 2004 ; Yezza 2004). Ces travaux montrent que l'activité protéolytique augmente graduellement au cours de la fermentation et qu'elle peut atteindre une valeur maximale à la fin de la fermentation⁹³. Les protéines complexes des boues stimulent constamment la production de protéases. Les boues fermentées atteignent une activité protéolytique maximale lorsque la lyse cellulaire est plus importante. Une grande quantité de protéases intracellulaires libérées dans le milieu augmentent alors l'activité protéolytique. Selon la Figure 24, l'activité protéolytique maximale survient plus tôt pour l'expérience TOS (30h). Les activités maximales sont obtenues après 36h dans les autres cas. Dans le cas de l'expérience ALS, une forte activité protéolytique est également observée après 48h. Ces résultats indiquent que les caractéristiques des boues

⁹³ Tyagi et al. (2002) ont obtenu une valeur maximale de 4,50 UI/ml à 36h. L'activité protéolytique augmentait graduellement jusqu'à 18h et fluctuait légèrement jusqu'à 30h. Après 36h, l'activité diminuait pour atteindre environ 1 UI/ml à 48h. Lamontagne (2004) a obtenu la plus forte activité à 48h (2,13 UI/ml). L'augmentation graduelle a été observée jusqu'à 30h (1,92 UI/ml). L'activité a ensuite légèrement fluctué pour atteindre sa valeur maximale à 48h. Yezza (2004) a observé une augmentation graduelle et obtenu une activité maximale à 36h (environ 5,00 UI/ml). Une valeur légèrement inférieure a été observée à 48h. Dans le présent travail, l'activité maximale a été atteinte après 36h (1,34 UI/ml) comme Tyagi et al. (2002) et Yezza (2004). Toutefois, elle est inférieure à celles observées par ces chercheurs. Elle est aussi légèrement différente de celle de Lamontagne (2004) après 36h (2,03 UI/ml). Il est possible qu'une activité protéolytique plus élevée, à un temps non échantillonné, n'ait pas été décelée.

influencent la production de protéases et qu'elle ne dépend pas uniquement de la complexité des protéines, mais d'autres facteurs comme la concentration en cellules viables et le processus de sporulation. Si le test enzymatique est réalisé sur des échantillons récoltés au début de la sporulation (production intense de protéases) ou de la phase de déclin (libération de protéases intracellulaires), des activités protéolytiques plus élevées seraient potentiellement mesurées.

Le ratio *Act.proteo./prot.solubles* est deux fois plus faible dans le milieu soja par rapport à toutes les autres expériences avec les boues. Cette observation suggère que les protéases produites dans le milieu soja sont moins fonctionnelles en terme d'activité protéolytique. Les ratios *Act.proteo./prot.solubles* plus élevés dans les boues suggèrent que les protéases de Bt aient de nouvelles caractéristiques et soient plus fonctionnelles. Cette observation corrobore les travaux antérieurs de Lamontagne (2004) sur la caractérisation des protéases de Btk HD-1 produites dans les boues. En comparaison avec le milieu soja, l'auteure a démontré que les protéases alcalines de Btk HD-1 produites dans les boues étaient plus fonctionnelles (en terme d'activité enzymatique) à des températures de 40°C, 50°C et 60°C, et à des pH de 9 et 11. Elle a démontré aussi que les métalloprotéases de Btk HD-1 produits dans les boues étaient plus fonctionnelles à pH 7 et à des températures de 40°C, 50°C et 60°C. De plus, les protéases de Btk HD-1 des boues seraient plus thermostables (80% de l'activité enzymatique maintenue après 150 min) que celles du milieu soja (30% de de l'activité enzymatique maintenue après 150 min). Cependant, les protéases produites par Btk HD-1 dans les boues et dans le milieu soja ont la même sensibilité envers les inhibiteurs EDTA (spécifique aux métalloprotéases en retirant l'ion métallique du site actif) et PMSM (interaction avec le groupement sérine des protéases alcalines par phosphorylation ou fluorisation). Ces observations sont importantes puisque, malgré la possibilité qu'elles attaquent les facteurs de virulence protéiques durant la fermentation, les protéases peuvent contribuer à l'entomotoxicité en dégradant des protéines au sein de l'insecte qui sont susceptibles d'interférer avec les facteurs de virulence de Bt (voir section 2.1.4.2).

6.3.2.2.6 Viscosité

Bien que la concentration en MES soit plus élevée dans les expériences avec les boues hydrolysées (entre 30 et 37 g/l), leur viscosité est néanmoins inférieure à celle des boues non hydrolysées (25 g/l) selon la Figure 24. L'hydrolyse brise les membranes cellulaires (cellules ou débris) et les liens moléculaires des floes et des biofilms qui sont responsables en partie de la viscosité. Suite à l'hydrolyse, les surfaces des molécules simplifiées, des cellules et des débris cellulaires ont une charge négative plus élevée, ce qui crée une répulsion électrostatique prévenant l'agglomération

des particules (Neyens et al., 2003a). De plus, l'hydrolyse s'attaque aux PEC qui sont principalement responsables de l'intégrité fonctionnelle et structurale des floccs et des biofilms (Neyens et al., 2004).

Les faibles viscosités initiales des boues hydrolysées favorisent le transfert de l'oxygène dans le milieu et le transfert de masse de plusieurs monomères et polymères (saccharides et protéines) (Brar, 2004). Cela peut expliquer les bons rendements en entomotoxicité. En cumulant les effets de la diminution de la taille des particules, cela explique aussi les concentrations initiales en OD élevées des boues hydrolysées par rapport au contrôle.

En théorie, dans les milieux de fermentation synthétiques, la viscosité du milieu augmente avec l'accroissement de la biomasse cellulaire. Cependant, lorsque la lyse cellulaire survient durant la phase stationnaire de croissance et la phase de déclin, la viscosité diminue. La viscosité finale est plus élevée que la viscosité initiale. Dans les boues non hydrolysées (contrôle), on observe plutôt une diminution graduelle de la viscosité au cours des trois quarts de la durée de fermentation (voir Figure 25). La baisse de la viscosité s'explique au début par la dégradation des MES et de leurs PEC associés suite à l'activité enzymatique et au bris des floccs par l'agitateur et les chicanes. Plus tard au cours de la fermentation, la dégradation continue des matières en suspension et des PEC ainsi que la lyse cellulaire sont responsables de la baisse de la viscosité. Finalement, la viscosité augmente après 36h avec les PEC, libérés lors de la lyse cellulaire, qui se lient à des particules solides et d'autres PEC endogènes pour former de nouveaux agglomérats.

Dans les boues ayant subies une hydrolyse alcaline et une hydrolyse thermo-alcaline, la viscosité ne varie pas au cours des premières heures de fermentation. L'impact de l'hydrolyse sur la viscosité semble plus important que celui associé à l'augmentation de la biomasse cellulaire. Dans les boues hydrolysées à pH alcalin, les cellules atteignent une concentration entre 15h et 18h qui est suffisante pour augmenter la viscosité. Durant cette période, Bt synthétise plusieurs PEC qui contribuent à augmenter la viscosité. Cela se produit plus tôt entre 6h et 9h avec les boues hydrolysées à pH alcalin et à température élevée. Une fois que la viscosité maximale est atteinte (après 24h pour l'hydrolyse alcaline et après 12h pour l'hydrolyse thermo-alcaline), la viscosité diminue suite à la lyse cellulaire, la dégradation continue des MES et de leurs PEC associés par l'activité enzymatique, et au bris des floccs par l'agitateur et les chicanes. Aucune augmentation n'est observée par rapport au contrôle. L'impact des PEC libérés lors de la lyse cellulaire sur l'augmentation de la viscosité est surpassé par les facteurs énumérés précédemment.

Pour le traitement thermo-oxydant, la viscosité augmente plus au début de la fermentation après 3h et atteint une forte valeur après 9h. L'augmentation du nombre de cellules et la synthèse de PEC ont contribué à cette augmentation. La viscosité diminue légèrement entre 9h et 21h suite à la lyse cellulaire, la dégradation continue des matières en suspension et de leurs PEC associés par l'activité enzymatique, et au bris des floccs par l'agitateur et les chicanes. Elle remonte ensuite pour atteindre une valeur maximale après 30h. Cette remontée peut s'expliquer par les PEC, libérés lors de la lyse cellulaire ou synthétisés par de jeunes cellules, qui se lient à des particules solides et d'autres PEC endogènes pour former des agglomérats. Finalement, la viscosité diminue entre 30h et 33h jusqu'à la fin de l'expérience. Selon la courbe de croissance, la concentration en cellules viables ne décroît pas entre 30h et 48h. Les nouveaux agglomérats formés (et les autres déjà présents dans les boues) ont pu être brisés par l'agitation et les contacts avec les chicanes.

6.3.2.2.7 Taille des particules

Les particules présentes dans le milieu peuvent interférer avec le métabolisme de Bt, phénomène souvent référé à l'inhibition par le substrat (voir sous-section 2.2.2.2.3). L'inhibition par le substrat peut avoir un effet propre aux bactéries sporulantes. Selon Sacheveda et al. (1999), la présence de floccs dans les boues plus concentrées peut prévenir la sporulation en générant des conditions persistances en sources de carbone et d'azote simples qui sont libérés sous l'action des enzymes bactériennes. Les mécanismes associés à la sporulation comme la production des CPI pourraient alors être affectés par la présence d'une grande quantité de MES. Il est possible aussi que ces floccs contiennent des molécules susceptibles de provoquer la germination de la spore et la désynchronisation de la sporulation.

Le phénomène d'inhibition par le substrat est une hypothèse qui peut expliquer les faibles rendements de Bt dans les boues concentrées (<25 g MES/l) observés par Lacchab et al. (2001) et Vidarthi et al. (2002). Dans ce travail, les boues hydrolysées contenaient de 30,4 à 37,4 g MES/l. Selon la Figure 26, la taille initiale des particules est plus petite dans les boues hydrolysées que celles dans les boues non hydrolysées. L'hydrolyse a un effet considérable sur les particules des boues en brisant les amas de matière organique et de débris cellulaires. Pour toutes les boues fermentées, la diminution de la taille des particules est observée tout au long de l'expérience. Bt détient un bagage enzymatique adapté à ce type de milieu et dégrade aisément les particules organiques qui s'y trouvent. L'agitation continue et le contact des particules avec les chicanes contribuent également à briser les particules et à diminuer leur taille. Ces diminutions atténuent le

phénomène d'inhibition par le substrat et sont ainsi favorables à la productivité de Bt dans les boues, particulièrement celles qui ont été hydrolysées.

La taille des particules est un paramètre important pour l'étape de la formulation d'un bio-insecticide (Mor et Matthews, 2003). La nature peu commune du substrat est susceptible de compliquer la formulation du produit en fonction des besoins et des contraintes se manifestant dans le créneau du marché ciblé. Les particules des suspensions insecticides ne doivent pas interférer avec l'équipement standard pour pulvériser les bio-insecticides. Pour permettre la pulvérisation aérienne, la taille des particules dans les bio-insecticides à base de Btk HD-1 ne doit pas excéder 10 μm (Sacheveda et al., 1999). Les résultats sont de bonne augure pour la formulation du produit du procédé BT-INRS : la taille des particules des boues fermentées se situe entre 1,7 et 5,4 μm .

La taille de particules d'un bio-insecticide peut aussi influencer le comportement alimentaire de la larve ciblée selon Thiéry et al. (1998). Toutefois, les auteurs ne spécifient pas la taille recommandée des particules.

6.3.2.2.8 Type d'énergie thermique utilisée pour l'hydrolyse

Pour des raisons de pratique, l'hydrolyse thermo-alcaline a été réalisée par injection de vapeur directement dans les boues avant de les transférer dans les fermenteurs. L'injection par la vapeur est une méthode thermique qui diffère des ondes micro-ondes utilisées pour les expériences en fioles Erlenmeyer. La vapeur provoque l'hydrolyse des molécules en brisant leurs liens intramoléculaires. Cette méthode est moins dispendieuse que les ondes micro-ondes car moins d'énergie est exigée pour générer la vapeur. Les micro-ondes brisent aussi les liens intramoléculaires par hydrolyse thermique. Les micro-ondes sont une forme d'énergie électromagnétique qui voyage à la vitesse de la lumière. Les surfaces métalliques reflètent les micro-ondes, mais les molécules polaires comme l'eau, les protéines et les acides gras les adsorbent. Elles font vibrer les molécules à haute fréquence, ce qui produit un effet de chaleur. Toutefois, les micro-ondes entraînent des effets non thermiques (Banik et al., 2003) : elles provoquent l'accélération des ions et déstabilisent les dipôles, ce qui modifie la structure secondaire et tertiaire des protéines. Comme les protéines sont un élément clé pour la production de Bt dans les boues, cela suggère que le rendement de Bt puisse être différent selon le type d'hydrolyse thermique. Une expérience a été menée en fioles Erlenmeyer sur les deux types d'hydrolyse thermique utilisés dans ce travail. Le Tableau 34 présente ces résultats en comparaison avec les expériences de validation en fioles Erlenmeyer correspondantes.

Tableau 34 Essais en fioles Erlenmeyer avec les boues secondaires hydrolysées par injection de vapeur (suivie d'une stérilisation). Résultats après 48h de fermentation par Btk HD-1. Comparaison avec les essais de validation en Erlenmeyer (boues hydrolysées par micro-onde). TAS = hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires ; TOS = traitement thermo-oxydant des boues secondaires.

Énergie thermique	Expérience	Spores viables (UFC/ml)		Sporulation (%)	Entomotoxicité (UIx10 ³ /μl)	
		Valeur	Diff. (%) ²		Valeur	Diff. (%) ²
Micro-onde	TAS ¹	36,0		75,3	16,4	
	TOS ¹	48,3		83,7	17,7	
Injection de vapeur	TAS	23,4	-35,0	73,6	14,5	-11,6
	TOS	22,9	-52,6	72,6	15,6	-12,3

¹ Résultats des expériences TAS et TOS de validation en fioles Erlenmeyer (section 6.3.1.1).

² La différence correspond à l'écart relatif avec les expériences respectives utilisant l'énergie micro-onde.

Les résultats indiquent que les concentrations en spores sont différentes et que les entomotoxicités varient peu selon le type d'énergie thermique utilisé pour l'hydrolyse thermo-alcaline. Les rendements de Bt (nombre de spores produites, entomotoxicité...) varient selon la composition du milieu de culture. Dans ce cas-ci, le processus de sporulation est plus sensible aux nouvelles caractéristiques des boues traitées avec différentes énergies thermiques. Il n'est pas possible pour l'instant de connaître les nouvelles caractéristiques des boues après une hydrolyse par injection de vapeur car les analyses ont seulement été réalisées sur les boues hydrolysées aux micro-ondes. Il serait intéressant dans des travaux ultérieurs d'analyser la composition des boues après une hydrolyse thermo-alcaline par injection de vapeur et de déceler les facteurs susceptibles d'influencer les rendements de Bt, particulièrement le contenu en protéines et en carbone organique dissous.

6.3.2.2.9 Quantité de NaOH consommée durant la fermentation

Le sodium a été identifié préalablement comme un effecteur positif pour l'entomotoxicité de Btk HD-1 (section 5.3). Entre 100 et 200 ml de NaOH 4N (ou 0,027 à 0,043 g NaOH/ g MES) étaient ajoutés pour ajuster le pH lors des traitements. De plus, du sodium a été ajouté lors de la fermentation car le pH était contrôlé avec le NaOH. Toutefois, la quantité totale ajoutée est minime par rapport au volume de travail (10 litres). Seulement 120 ml de NaOH 2N ont été ajoutés durant la fermentation des boues non traitées (0,038 g NaOH/ g MES). Environ 295 ml, 230 ml et 200 ml de NaOH 2N ont été respectivement ajoutés dans les boues ayant subies une hydrolyse alcaline, une hydrolyse thermo-alcaline et un traitement thermo-oxydant (correspondant à 0,063, 0,061,

0,044 g NaOH/ g MES)⁹⁴. Les boues traitées contiennent plus de sodium que les boues non traitées et cela peut avoir contribué à leurs fortes entomotoxicités. Dans le cas du milieu soja, un plus grand volume de NaOH a été ajouté (425 ml), mais l'entomotoxicité observée est inférieure à celles des boues. Les protéines contenues dans le milieu soja sont moins complexes que celles des boues. Elles requièrent peut-être peu d'ions sodium pour accroître leur solubilité ou pour faciliter leur passage à travers la membrane bactérienne, contrairement aux protéines complexes des boues.

6.3.2.2.10 Formation de mousse

La formation de mousse est un phénomène normal lors des fermentations où de l'oxygène est injecté dans le milieu de culture. Durant la stérilisation et la fermentation de boues, les débris cellulaires, les MES et les PEC peuvent être responsables de la formation de mousse. Les traitements des boues peuvent contribuer à la formation de mousse. Certains libèrent des PEC qui sont susceptibles de provoquer de la mousse comme l'hydrolyse alcaline. D'autres traitements sont reconnus pour réduire la mousse lors des digestions aérobies comme l'hydrolyse thermique (Barjenbruch et Kopplow, 2003). La mousse devient une source de contamination si elle atteint la partie supérieure du fermenteur où les injecteurs d'acide, de base et d'anti-mousse chimique et la sortie des gaz se situent. Pour le procédé BT-INRS, l'entomotoxicité et le nombre de spores produites peuvent être sous-estimés en raison des métabolites insecticides et des spores qui peuvent s'adsorber sur la mousse. Outre l'utilisation d'un brise-mousse mécanique, le polypropylène glycol est normalement utilisé pour contrôler la mousse durant la production de Bt. Ce type d'anti-mousse chimique peut inhiber la croissance bactérienne et nuire au transfert de l'oxygène à l'interface gaz-liquide (Huang et al., 1991). Des recherches ont été réalisées pour contrôler la mousse lors de la fermentation de boues sans utiliser d'anti-mousse chimique (Vidyardhi et al., 2000). Des anti-mousses économiques de nature végétale (huiles végétales commerciales) ont été testés. Ils atténuent efficacement les problèmes de mousse, mais des quantités importantes sont requises durant la fermentation.

Dans ce travail, la mousse a été contrôlée durant la stérilisation en modifiant l'agitation au cours de la période critique de formation de mousse (entre 100°C et 105°C). Il a été plus facile de contrôler la mousse lors de la stérilisation des boues hydrolysées que celle formée avec les boues non

⁹⁴ Dans ce travail, 390 ml de H₂SO₄ (2N) durant l'expérience contrôle. Pour le milieu soja, l'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse thermo-alcaline et le prétraitement thermo-oxydant, près de 800 ml, 500 ml, 550 ml, et 700 ml de H₂SO₄ (2N). Ces valeurs indiquent qu'une plus grande quantité d'acide a été consommée avec les boues hydrolysées. La concentration en MES est d'ailleurs plus élevée dans ces

hydrolysées. Durant la fermentation, la formation de mousse était contrôlée par l'ajout d'anti-mousse chimique et par un brise-mousse mécanique. Un niveau important de mousse persistait lors de la fermentation de boues non hydrolysées, sans toutefois toucher la partie supérieure du fermenteur (voir Figure 27). Une couche de mousse dense constituée de petites bulles d'air recouvrait une seconde couche constituée de grosses bulles d'air. Cette mousse, communément appelée « mousse permanente », réagissait peu à l'ajout d'anti-mousse chimique. Sa couleur était plus foncée. Pour les boues hydrolysées, la mousse formée était plus facile à contrôler puisqu'il n'y avait pas de mousse permanente. Néanmoins, la mousse était présente en grande quantité durant toute l'expérience. Dans des travaux ultérieurs, il serait intéressant d'analyser la composition de la mousse pour vérifier si le phénomène d'adsorption des spores et des CPI est important. Si c'est le cas, il serait souhaitable d'équiper les appareils de fermentation avec un récupérateur de mousse pour la recirculer dans le bouillon fermenté. L'entomotoxicité après 30h ou 36h serait peut-être élevée.

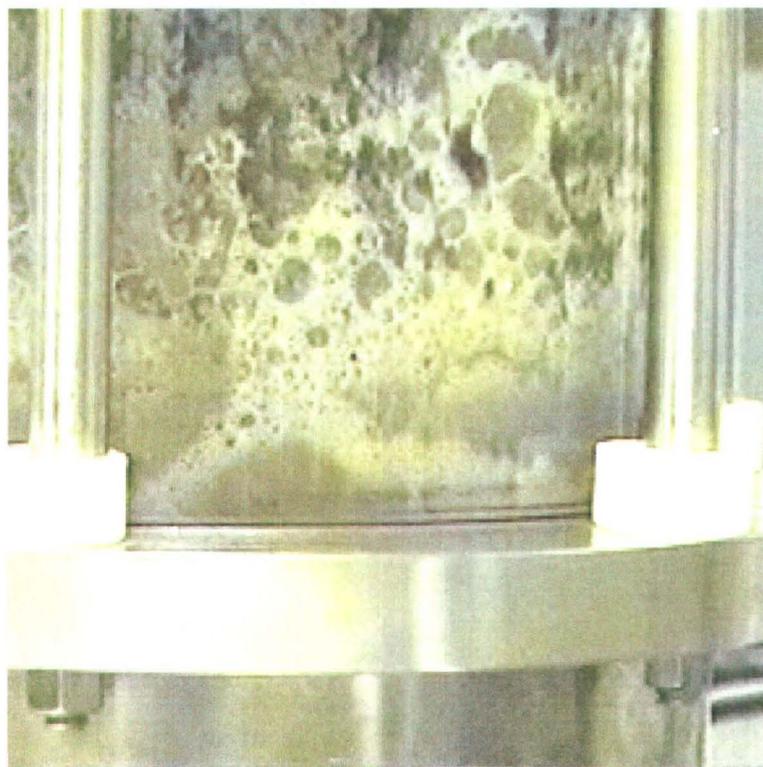


Figure 27 Formation de mousse durant la fermentation de boues secondaires non hydrolysées par Btk HD-1 en fermenteur de 15 litres.

expériences. Plus de ions H^+ seraient adsorbés sur la partie organique des MES. Le pouvoir tampon des boues peut aussi avoir diminué avec l'hydrolyse. C'est pour ces raisons qu'une plus grande quantité de H_2SO_4 2N aurait été utilisée.

6.3.2.2.11 Impacts potentiels d'un traitement des boues sur le coût de production de Bt

Les résultats indiquent que les boues nécessitent un traitement afin de maximiser le potentiel des boues à devenir un milieu de culture adéquat pour la croissance microbienne et stimulant pour la production de spores ou de métabolites secondaires d'intérêt commercial. Une étape de traitement en amont (traitement des boues) sera éventuellement ajoutée au procédé BT-INRS. Cette étape exigera un équipement particulier (hydrolyseur à grande capacité). Cela impliquera des coûts de fonctionnement et d'entretien et requerra une consommation supplémentaire d'énergie et de produits chimiques (ex. : NaOH) pour effectuer les hydrolyses chimiques ou thermo-chimiques.

Pour une question de coût, la durée de la fermentation est très importante lors de la production à l'échelle industrielle. Si la fermentation est de courte durée, plus tôt l'entomotoxicité maximale sera atteinte et meilleure sera la productivité du procédé (Lisansky, 1999-2000). Haug et al. (1983) mentionnent que les coûts d'énergie pour l'hydrolyse des boues à traiter peuvent être compensés par l'économie en énergie relative à la diminution du temps de traitement. Les auteurs ont calculé une consommation énergétique inférieure (moins de 25%) lorsque des boues traitées étaient digérées. Dans ce travail, une forte entomotoxicité est atteinte après 30h de fermentation dans les boues non hydrolysées alors que les plus fortes valeurs sont atteintes entre 36h et 48h dans les boues hydrolysées. Les traitements n'ont pas diminué le temps de fermentation requis pour avoir une entomotoxicité maximale. Cependant, en considérant l'erreur de la méthode (7%), les différences de l'entomotoxicité après 36h et 48h pour l'hydrolyse thermo-alcaline, et celles après 30h, 36h et 48h pour le traitement thermo-oxydant, sont moindres. Dans ces deux cas, il serait envisageable de réduire le temps de fermentation (36h pour l'hydrolyse thermo-alcaline et 30h pour le traitement thermo-oxydant). Il est possible aussi que des entomotoxicités maximales puissent être détectées à des temps d'échantillonnage différents entre 30h-36h ou 36h-48h. Il serait intéressant d'explorer cette possibilité lors des futures fermentations de boues traitées.

Lisansky (1999-2000) calcule le coût de production de Bt selon l'entomotoxicité du bouillon fermenté à la fin de la fermentation. En augmentant l'entomotoxicité de 5 à 6 fois, il est possible de réduire le coût de production d'un facteur de 2 à 3. Dans ce travail, les boues hydrolysées améliorent le rendement de Btk HD-1 d'un facteur de 2,7 à 2,9 par rapport au milieu soja après 48h. La diminution du coût associée à la hausse de l'entomotoxicité dans les boues hydrolysées, cumulée aux économies sur la matière première, pourrait compenser pour le coût supplémentaire relatif au traitement. Une estimation des coûts permettrait de vérifier si le traitement des boues est efficient. À ce propos, Rowe et Margaritis (2004) ont publié une excellente analyse économique

sur la production commerciale de bio-insecticides à base de Btk HD-1. L'analyse est très juste et pourrait s'appliquer au procédé BT-INRS⁹⁵.

Finalement, une autre façon de contourner les coûts supplémentaires associés à l'hydrolyse serait de l'intégrer à l'étape de la stérilisation des boues utilisées par le procédé BT-INRS. Cela s'appliquerait seulement à l'hydrolyse thermo-alkaline et les boues hydrolysées seraient ensuite transférées dans le bioréacteur. Il serait alors intéressant de tester cette possibilité et d'étudier l'effet de l'hydrolyse thermo-alkaline en excluant la stérilisation.

⁹⁵ L'équipement requis pour le procédé BT-INRS est différent de celui du procédé conventionnel de production de Bt. Néanmoins, les cuves normalement utilisées pour mélanger les ingrédients du milieu de culture et les stériliser pourraient être remplacées par un tamiseur (pour retirer les grains de silice), un décanteur (pour concentrer les boues) et un hydrolyseur dont les coûts d'entretien et de fonctionnement seraient inférieurs ou équivalents à ceux des cuves.

CHAPITRE 7: ÉVALUATION DE L'ENTOMOTOXICITÉ DES SPORES ET DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DE BT HD-1 PRODUITS DANS LES BOUES D'ÉPURATION

Ce chapitre présente une étude sur l'entomotoxicité des produits de Btk HD-1 obtenus dans les boues fermentées. Les méthodes utilisées sont d'abord décrites. Les résultats sont ensuite présentés. Une discussion des résultats complète le chapitre.

7.1 Choix des méthodes

Les spores et les métabolites insecticides (CPI, enzymes, PVI...) sont les principaux produits microbiens de Btk impliqués dans l'entomotoxicité du bio-insecticide. Le compte des spores viables et l'évaluation de l'entomotoxicité par les bio-essais donnent très peu d'information sur l'influence de chaque produit microbien de Btk envers le pouvoir entomotoxique du bio-insecticide. En effet, l'obtention d'une forte entomotoxicité peut s'expliquer par la production d'une plus grande quantité de spores et de métabolites secondaires insecticides ou par la présence de produits plus actifs en terme de pouvoir insecticide. Aucune étude n'a été effectuée pour déterminer le ou les éléments entomotoxiques dominants dans les boues fermentées par Btk. Cette information est importante pour la formulation et l'enregistrement du produit final du procédé BT-INRS. Elle peut orienter les recherches sur les additifs à ajouter pour stabiliser le bio-insecticide. Elle permettra également de répondre aux questions des responsables de l'enregistrement (Agence de réglementation sur la lutte anti-parasitaire de Santé Canada, Agence de protection environnementale américaine...) sur les ingrédients actifs du bio-insecticide.

Dans la partie de ce travail, l'entomotoxicité des suspensions suivantes a été évaluée :

- Les CPI purifiés ;
- Les spores viables purifiées ;
- Le surnageant du bouillon fermenté centrifugé contenant les métabolites secondaires insecticides solubles dont les PVI et les enzymes (les CPI et les spores sont absents dans le surnageant car ils sont concentrés dans le culot du bouillon fermenté) ;

- La combinaison des spores et des CPI contenus dans le culot du bouillon fermenté centrifugé et lavé à plusieurs reprises pour retirer les débris cellulaires (cette mesure permet d'évaluer le degré de la synergie spores-CPI dans les différents milieux).

Les bouillons fermentés des expériences de validation en fioles Erlenmeyer (section 6.3.1) ont été utilisés pour cette partie du travail. Les deux réplifications de chaque expérience ont été mélangées ensemble en milieu aseptique pour obtenir environ 200 ml de bouillon fermenté. Ce volume était suffisant pour préparer les différentes fractions du bouillon fermenté à analyser.

L'étude des cristaux protéiques insecticides (CPI) et des spores de Bt requiert leur séparation du milieu de culture pour qu'aucun métabolite ou autre élément du milieu de culture n'interfère durant les analyses. Leur densité permet de les séparer efficacement par centrifugation. Pour des analyses plus poussées sur les CPI et les spores, il faut les purifier selon diverses méthodes : la séparation en deux phases (Angus, 1959) ; la séparation par des gradients de densités (Fast, 1972 ; Sharpe et al., 1975 ; Bulla et al., 1979 ; Mahillon et Delcour, 1984 ; Thiéry et al. 1998 ; Rojas-Avelizapa et al., 1999 ; Lui et Tzeng, 2002 ; Thomas et Ellar, 1983 ; Mohan et Gujar, 2001 ; Li et al., 2002) ; le traitement sonore (Faloci et al., 1990 ; Thiéry et al., 1998) ; l'irradiation (Becker, 2002) ; la séparation par flottaison/décantation (Rivard, 1999). Pour purifier les spores, quelques chercheurs recommandent de dissoudre préalablement les cristaux (Yousten et Rogoff, 1969 ; Hannay et Fitz-James, 1955) et/ou utiliser les techniques de séparation pour purifier les CPI. La méthode de séparation par gradients de densité est celle qui a été sélectionnée dans ce travail parce qu'elle est couramment utilisée et éprouvée par des chercheurs reconnus dans le secteur du biocontrôle dont Thomas et Ellar (1983) ainsi que Sharpe et al. (1975). Cette méthode consiste à faire une ultracentrifugation à travers un gradient de sucrose, de chlorure de césium ou de bromure de sodium. Un autre gradient qui ne nécessite pas d'ultracentrifugation, soit le Renografin, peut être aussi utilisé (Milne et al., 1977). Le sucrose a été choisi dans ce travail car il s'agit du gradient utilisé par Thomas et Ellar (1983) et Sharpe et al. (1975) dont les travaux ont inspiré l'élaboration du protocole (section 4.5). Cette méthode inclut entre autres une étape de séparation solide/liquide par centrifugation qui permet d'obtenir un mélange de spores et de CPI (culot) et une solution contenant les métabolites dissous (surnageant), soit deux matrices sur lesquelles l'entomotoxicité a été évaluée. Le protocole est résumé dans un schéma disponible à l'Annexe 6.

7.2 Résultats

Les surnageants de plusieurs bouillons fermentés, soit le milieu soja, les boues non traitées et traitées ont été soumis à des bio-essais. Les résultats sont illustrés à la Figure 28 et énumérés à l'Annexe 10. Les contrôles négatifs sur les surnageants sont aussi disponibles à l'Annexe 10. Les surnageants de boues non fermentés, traitées ou non traitées, ne présentent aucun effet entomotoxique vis-à-vis *C. occidentalis*. Le nombre de spores résiduelles dans les surnageants se situe entre $3,2 \times 10^4$ et $3,0 \times 10^5$ UFC/ml.

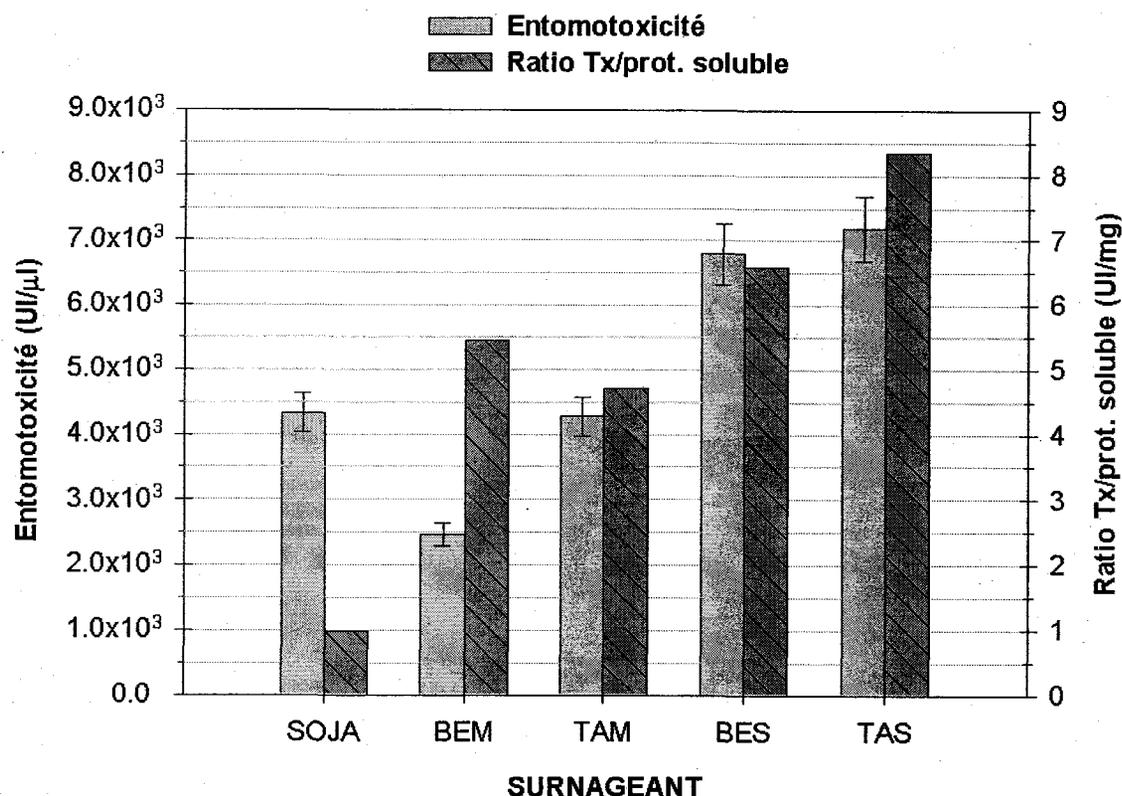


Figure 28 Entomotoxicité et ratio *Tx/prot.soluble* du surnageant de divers suspensions de Btk HD-1. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; TAM = Hydrolyse thermoalcaline des boues mixtes ; BES = Boues secondaires ; TAS = Hydrolyse thermoalcaline des boues secondaires.

Les surnageants des BES hydrolysées et non hydrolysées ont des entomotoxicités supérieures ($> 6,8 \times 10^3$ UI/μl) au milieu soja ($4,3 \times 10^3$ UI/μl) et aux BEM ($< 4,3 \times 10^3$ UI/μl). De plus, leur ratio *Tx/prot.soluble* est plus élevé ($> 6,6$ UI/mg de protéines solubles). Le surnageant des BEM non hydrolysées a une entomotoxicité inférieure au milieu soja ($2,5 \times 10^3$ UI/μl). Toutefois, son ratio *Tx/prot.soluble* est grandement plus élevé (5,4 UI/mg de protéines solubles pour les BEM vis-à-vis

1,0 UI/mg de protéines solubles pour le milieu soja). Pour le surnageant des BEM hydrolysées (TAM), l'entomotoxicité est du même ordre que le milieu soja, mais un fort ratio *Tx/prot.soluble* est observé (4,7 UI/mg de protéines solubles).

Pour les culots des bouillons fermentés, les résultats sont illustrés à la Figure 29. Les données sont disponibles à l'Annexe 10. Les contrôles négatifs sur les culots de boues non fermentés, traitées ou non traitées sont aussi disponibles à l'Annexe 10. Aucun effet entomotoxique vis-à-vis *C. occidentalis* n'a été observé avec les contrôles négatifs.

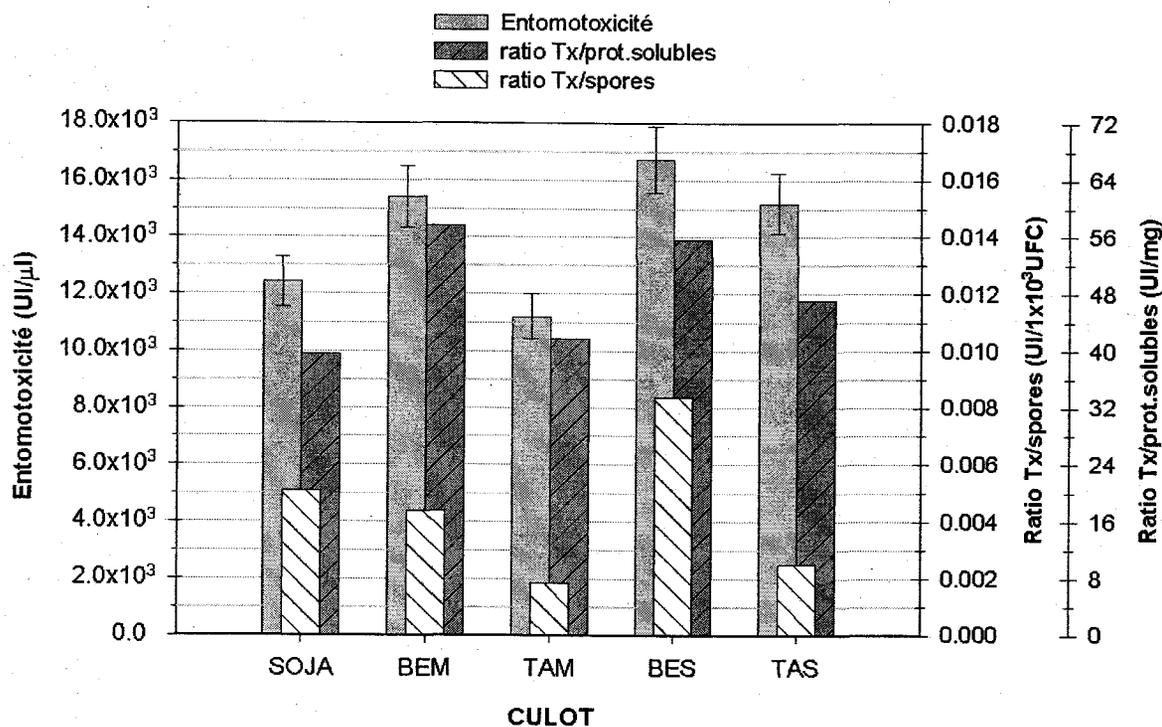


Figure 29

Entomotoxicité et ratios *Tx/prot.soluble* et *Tx/spores* du culot de divers suspensions de Btk HD-1. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; TAM = Hydrolyse thermo-alcaline des boues mixtes ; BES = Boues secondaires ; TAS = Hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires.

Seul le ratio *Tx/spores* du culot des BES non hydrolysées (0,008 UI/1x10³spores) se démarque des autres culots (entre 0,002 et 0,005 UI/1x10³spores). Le culot du milieu soja a un ratio *Tx/spores* supérieur (0,005 UI/1x10³spores) aux ratios identiques des deux boues hydrolysées testées (0,002 UI/1x10³spores).

Les ratios *Tx/prot.solubles* du culot ont été calculés selon les mesures du contenu en protéines solubles effectuées sur les échantillons dans lesquels les CPI ont été dissous⁹⁶. Les ratios *Tx/prot.solubles* du culot des BEM et BES non hydrolysées et des BES traitées sont plus élevés (>47,0 UI/mg de protéines solubles) que celui du culot du milieu soja (39,6 UI/mg de protéines solubles). Quant au ratio *Tx/prot.solubles* du culot des BEM hydrolysées (41,6 UI/mg de protéines solubles), il est équivalent à celui du milieu soja.

Les entomotoxicités spécifiques des suspensions de spores ou de cristaux purifiés sont présentés à la Figure 30. Les données sont disponibles à l'Annexe 10.

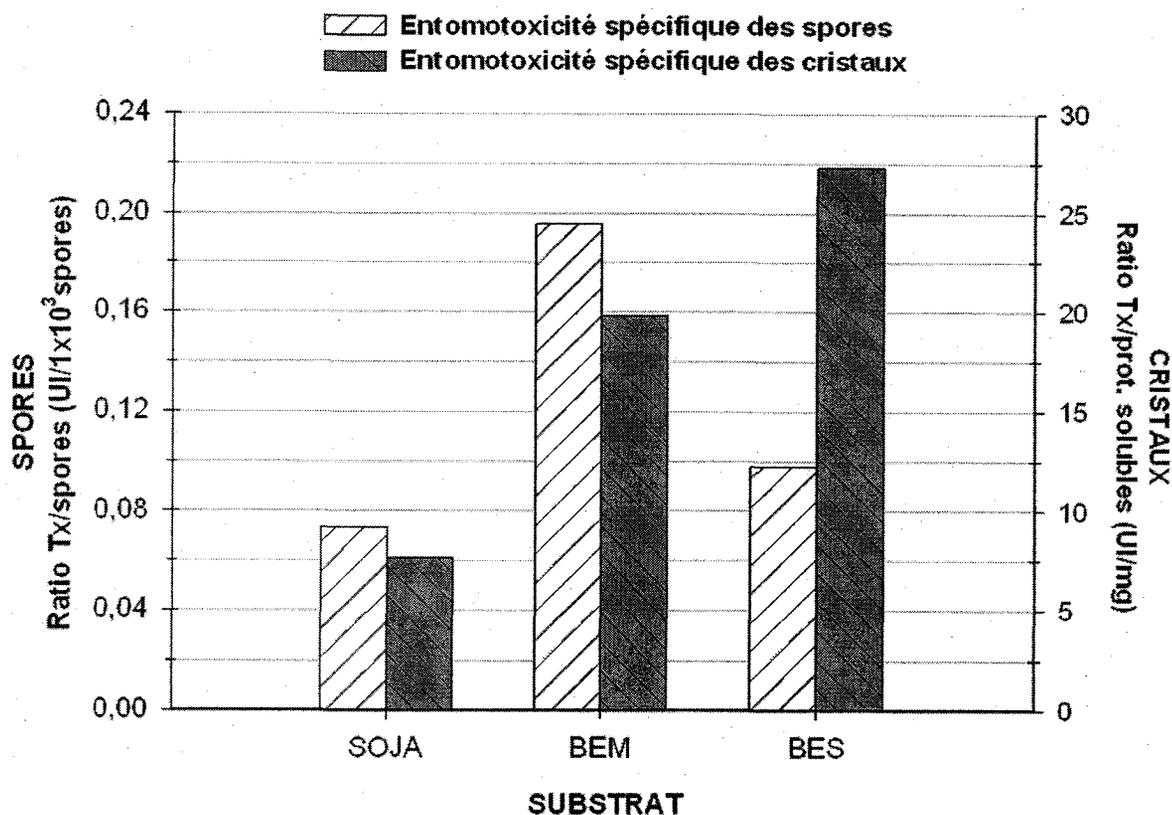


Figure 30 Entomotoxicité spécifique des spores et des cristaux purifiés de Btk HD-1 produits dans différents substrats. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; BES = Boues secondaires.

La quantité de protéines solubles résiduelles (pour la plupart des CPI) dans les suspensions de spores se situe entre 0,002 et 0,071 mg/ml. Les protéines résiduelles ont été dissoutes avant la

⁹⁶ Signalons que les entomotoxicités ont été évaluées sur les culots avant la dissolution des CPI.

mesure du contenu en protéines solubles. Les spores purifiées ont été testées dans les bio-essais avant la dissolution des protéines résiduelles.

Pour les cristaux purifiés, le contenu en protéines solubles a été mesuré sur un aliquot de cristaux dissous. L'entomotoxicité des cristaux a été mesurée sur les suspensions de cristaux non dissous dont la concentration a été ajustée à 0,1 mg prot.solubles/ml pour les trois échantillons. La concentration de spores résiduelles dans les suspensions de cristaux se situe entre $4,5 \times 10^4$ et $4,0 \times 10^5$ UFC/ml.

Les rapports *Tx/spores* et *Tx/prot.solubles* des cristaux et des spores sont plus élevés dans les boues que dans le milieu soja. Le rapport *Tx/spores* est plus fort dans les BEM (0,2 UI/ 1×10^3 spores) alors que le rapport *Tx/prot.solubles* est plus élevé dans les BES (27,3 UI/mg de protéines solubles).

7.3 Discussion

Selon la littérature consultée, aucune étude n'a été effectuée sur l'entomotoxicité des surnageants, des culots, des spores et des cristaux purifiés de culture de Btk HD-1 envers les larves de la TBE. Les souches de Bt et les insectes cibles dans la littérature consultée sont différents. Les résultats de cette partie du travail enrichiront certainement les connaissances sur l'entomotoxicité spécifique des produits microbiens de Btk HD-1, particulièrement ceux produits dans les boues d'épuration.

7.3.1 Entomotoxicité du surnageant des bouillons fermentés

Le surnageant des bouillons fermentés contient majoritairement les métabolites solubles de Bt. Les métabolites insecticides potentiellement présents dans le surnageant sont les suivants : les exotoxines, les antibiotiques, les protéases, les chitinases, les protéines insecticides végétatives et/ou des protéines encore inconnues⁹⁷. L'entomotoxicité du surnageant correspond au pouvoir insecticide cumulé de ces métabolites solubles. La valeur observée exclut les effets entomotoxiques des spores et des CPI. Les métabolites insecticides solubles ne sont pas aussi virulents que la combinaison spore-CPI, mais ils peuvent affaiblir la larve qui se nourrit alors très peu et meurt lentement.

⁹⁷ Il est possible dans ce travail que des protéases et d'autres métabolites insecticides solubles soient adsorbés sur les spores, les CPI et les particules résiduelles des boues. Ces molécules adsorbées peuvent avoir été perdues après la centrifugation du bouillon fermenté. Il serait souhaitable d'étudier plus en détails ce phénomène d'adsorption afin de vérifier son impact sur l'entomotoxicité du surnageant ou autres paramètres d'intérêt (activité protéolytique, activité chinolytique...).

Selon les résultats, les BES offrent les meilleures conditions pour la formation de métabolites secondaires insecticides. Ces conditions sont améliorées lorsque les BES subissent préalablement une hydrolyse thermo-alkaline. Le contenu en protéines solubles est plus faible dans les BES que le milieu soja malgré une forte entomotoxicité. Cela suggère que plusieurs des protéines détectées dans le surnageant des BES aient un pouvoir insecticide. Cela suggère également que certaines des protéines détectées aient un plus grand pouvoir insecticide.

Il en est de même pour les BEM hydrolysées ou non hydrolysées, mais leur effet sur la production de métabolites secondaires insecticides est moins important que celui des BES. La composition différente des BEM et des BES, particulièrement en composés azotés, pourrait expliquer cette observation. Le faible contenu en protéines dissoutes des BEM après traitement (section 5.2.4) indique que les composés azotés sont complexes et résistent aux réactions d'hydrolyse et d'oxydation partielle. Les molécules azotées sont nécessaires à la formation des métabolites secondaires insecticides de nature protéique. L'énergie consommée pour dégrader les protéines et cataboliser les molécules azotées est plus importante dans les BEM. L'énergie est alors limitée pour produire une plus grande quantité de métabolites secondaires.

Des spores résiduelles sont présentes dans les surnageants. Le degré de contamination est similaire à celui des travaux d'Asano et al. (1995) portant sur l'entomotoxicité du surnageant d'une culture de Bt. Au microscope à contraste d'interférence différentielle, très peu de spores et de débris cellulaires sont visibles. Comme le surnageant n'est pas exempt de spores, ces derniers peuvent être impliqués dans l'entomotoxicité observée.

Il est impossible avec ces résultats de déterminer les métabolites insecticides dominants dans le surnageant. Aucune analyse spécifique sur le contenu de protéines entomotoxiques (PIV, protéases, chitinases, exotoxines) ou sur diverses activités enzymatiques (protéolytique, chinolytique...) n'a été faite. Il serait souhaitable dans des travaux ultérieurs de vérifier le ou les métabolites insecticides solubles dont la production est stimulée par les boues. Néanmoins, il est possible d'émettre des hypothèses sur la présence potentielle de métabolites insecticides solubles dans le surnageant. Les possibilités sont décrites dans les prochaines sous-sections.

7.3.1.1 Présence d'exotoxines et d'entérotoxine

Les souches de Bt secrètent des exotoxines (α , β , γ) et une entérotoxine (type *B. cereus*) dans la phase soluble du milieu qui sont retenus dans le surnageant (Asano et al., 1995). La souche utilisée dans ce travail ne fabrique pas de β -exotoxine qui est susceptible d'avoir un effet entomotoxique

sur les insectes. Btk HD-1 produit en très faible quantité des α -exotoxines et des entérotoxines. Ces toxines n'ont pas d'effet entomotoxique, mais peuvent affecter les cellules animales. Si les boues ont stimulé les mécanismes associés à la production de ces toxines, il sera important de vérifier leur présence dans la formulation du produit final du procédé BT-INRS puisqu'elles font l'objet de réglementations strictes dans le secteur du biocontrôle.

7.3.1.2 Présence de protéases

Les protéases produites par Bt peuvent contribuer à l'entomotoxicité en présence des spores et des CPI (section 2.1.4.2). Dans le cas des BES hydrolysées ou non hydrolysées, une faible activité protéolytique avait été détectée dans les bouillons fermentés (Tableau 28). Il est peu probable qu'elles seraient présentes en grande quantité dans le surnageant. Dans le cas des BEM hydrolysées ou non hydrolysées, une forte activité protéolytique et des ratios *Act.proteo./prot.solubles* élevés ont été observés. Ces protéases pourraient contribuer à l'entomotoxicité du surnageant. Si elles contribuent effectivement à l'entomotoxicité, l'effet n'est pas associé au mode d'action des CPI et des spores car ils sont absents du surnageant. Toutefois, les protéases pourraient permettre aux spores résiduelles du surnageant de provoquer la septicémie chez la larve. Les protéases affectent le mécanisme de défense des lépidoptères en dégradant des protéines antimicrobiennes (voir section 2.1.4). En combinaison avec le mode d'action des PIV (similaire à celui des CPI) et des chitinases sur les cellules intestinales, les protéases permettraient l'invasion des cellules bactériennes et des spores résiduelles dans le sang de l'insecte. Pour mieux définir leur contribution à l'entomotoxicité, il serait intéressant de tester le surnageant après y avoir ajouté un inhibiteur de protéases⁹⁸.

Il serait pertinent de déterminer si les protéases alcalines sont un métabolite secondaire dominant dans le surnageant des boues fermentées en évaluant leur quantité et leur performance en terme d'activité protéolytique. Si une plus grande quantité est observée, cela indiquerait que les boues stimulent leur production. Les travaux de Lamontagne (2004) indiquent que leurs fonctionnalités sont améliorées (pouvoir protéolytique plus élevée, meilleure thermostabilité, résistance accrue aux pH alcalins et inhibiteurs conventionnels). Si les boues stimulent leur production, elles deviendraient un substrat attrayant pour la production d'enzymes industrielles. En plus de faire des économies sur le milieu de culture, la plus grande productivité et les meilleures fonctionnalités enzymatiques diminueraient davantage les coûts de production et d'utilisation des enzymes

⁹⁸ Il serait alors important de choisir un inhibiteur de protéases spécifiques à celles de Bt qui n'interfère pas avec les protéases de l'insecte nécessaire à l'activation de la protoxine.

industrielles comme les protéases alcalines. Elles sont potentiellement un second produit d'intérêt commercial pour le procédé BT-INRS depuis que Tyagi et al. (2002) en ont fait la proposition.

7.3.1.3 Présence de chitinases

Les chitinases produites par Bt sont d'autres enzymes pouvant contribuer à l'entomotoxicité. Elles s'attaquent particulièrement à la membrane péritrophique constituée de chitine qui recouvre les cellules épithéliales de l'intestin et limite la pénétration des δ -endotoxines (Wiwat et al., 2000)⁹⁹. Il n'est pas possible d'évaluer le niveau de leur contribution car l'activité chinolytique n'a pas été déterminée. La complexité des boues et leur contenu en chitine ou en chitosane (chitine déacétylée) pourraient stimuler leur production. La présence potentielle de chitinase soulève l'intérêt de conserver le surnageant lors du traitement en aval du bouillon fermenté. Le surnageant pourrait être concentré et ajouté au produit final pour accroître son entomotoxicité. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs mentionné que l'addition de chitinases améliore l'entomotoxicité des insecticides (Smirnoff et Valéro, 1983 ; Sampson et Gooday, 1998).

7.3.1.4 Présence de protéines insecticides végétatives

Le surnageant peut contenir les PIV dont le mode d'action sur les larves s'apparente à celui des delta-endotoxines (Yu et al., 1997). Selon les travaux de Donovan et al. (2001), la souche utilisée dans ce travail (Btk HD-1) détient un gène *vip3A* codant pour une PIV. Les protéases et les chitinases potentiellement présentes dans le surnageant peuvent contribuer à l'action létale des PIV. Les chitinases percent la membrane péritrophique des cellules intestinales alors que les protéases protéolysent des molécules protéiques antimicrobiennes pouvant interférer avec l'action des PIV. D'ailleurs, Wiwat et al. (2000) n'excluent pas la possibilité que les PIV soient responsables de l'entomotoxicité du surnageant dans leurs travaux sur les effets histopathologiques des chitinases de Btk HD-1 envers *P. xylostella*.

7.3.1.5 Présence d'antibiotiques

Dans le secteur du biocontrôle, il existe des antibiotiques d'origine fongique ou bactérienne à la base de bactéricides, d'insecticides et de fongicides (Copping et Menn, 2000). Quelques espèces du

⁹⁹ Wiwat et al. (2000) ont publié un article dans lequel sont présentées des photographies intéressantes sur les cellules épithéliales de l'intestin des larves de *Plutella xylostella* (fausse-teigne des crucifères) affectées par des chitinases présents dans le surnageant d'une culture de Btk HD-1.

genre *Bacillus* sont à la base de bactéricide et de fongicide (ex. : *B. subtilis* qui produit l'iturine inhibant la germination des spores du champignon causant la pourriture brune ou la moniliose des arbres fruitiers). Bourque et al. (1992) ont démontré que Btk HD-1 produisait des substances antimicrobiennes qui inhibaient la croissance de quelques souches bactériennes et fongiques. Mohammedi (2004) a étudié la production de bactériocines chez plusieurs souches de Bt dans les boues. Les antibiotiques produits sont actifs contre *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*. La présence d'antibiotique dans le surnageant est possible, notamment si les conditions physico-chimiques complexes des boues d'épuration stimulent leur production. Les gènes des antibiotiques sont codés sur des plasmides qui sont exprimés dans des conditions environnementales complexes (Pelmont, 1994a). Si les boues imposent de telles conditions, des antibiotiques seraient produits. Il n'est pas possible pour l'instant de connaître leur contribution à l'entomotoxicité. Très peu d'études ont été réalisées sur les effets insecticides des antibiotiques de Bt¹⁰⁰. En somme, il serait pertinent de réaliser des études pour vérifier si les boues stimulent l'expression des gènes contenus sur les plasmides. Une surexpression des plasmides favoriserait non seulement la production des antibiotiques, mais aussi celle des gènes *cry*. Il deviendrait alors intéressant d'explorer la possibilité de cultiver les producteurs d'antibiotiques conventionnels ou nouveaux dans les boues d'épuration. Bien entendu, les secteurs du biocontrôle et de l'alimentation animale seraient les premiers créneaux visés car les fructueux marchés pharmaceutiques et médicaux n'accepteront pas l'utilisation de boues d'épuration pour produire des antibiotiques en raison des critères de qualité très strictes et des coûts potentiellement élevés de purification.

7.3.1.6 Importance du surnageant des boues fermentées par Bt

Le surnageant des boues fermentées par Btk HD-1 a des caractéristiques entomotoxiques intéressantes. Il est donc recommandé de le conserver et de le configurer afin qu'il puisse être ajouté comme additif lors la formulation du produit¹⁰¹. Des tests d'entomotoxicité pourraient alors être effectués pour vérifier si le surnageant accroît l'entomotoxicité. De plus, il serait souhaitable

¹⁰⁰ Ils interviennent peut-être au niveau de la flore microbienne intestinale de la larve et inhiber les microorganismes susceptibles de dégrader les facteurs de virulence de Bt. Toutefois, la flore intestinale joue un rôle dans l'entomotoxicité. L'entérototoxicose provoquée par les delta-endotoxines implique les microorganismes de la flore intestinale qui peuvent pénétrer les cavités, envahir le sang et causer une septicémie.

¹⁰¹ Toutefois, il est important de veiller à ce qu'il y ait peu d'exotoxine dans le surnageant pour assurer l'innocuité du produit final. Il serait souhaitable de quantifier les α -exotoxines et les entérotoxines potentiellement présentes dans le surnageant. Quant aux protéases, elles peuvent contribuer à l'instabilité des suspensions de Bt lors de leur entreposage. Il serait souhaitable les retirer du surnageant pour une éventuelle commercialisation. Une fois qu'il n'y a plus de protéases, le surnageant pourrait être concentré par filtration et ajouté comme additif lors de la formulation.

d'étudier de façon plus approfondie le contenu du surnageant et identifier les éléments entomotoxiques dominants.

De façon globale, les résultats suggèrent que les boues soient un milieu très stimulant pour la production de métabolites de nature protéique. Elles stimulent leur surproduction ou accroissent leurs fonctionnalités. Les tendances actuelles des recherches en génie de protéines et en enzymologie mettent l'accent sur la biologie moléculaire pour développer de nouvelles fonctionnalités, améliorer des fonctions connues ou surproduire les métabolites désirés. La compréhension des mécanismes de production des protéines et des enzymes dans les boues apporterait certainement des connaissances novatrices pour le génie des protéines et l'enzymologie. Cet apport scientifique favoriserait l'utilisation de milieux de culture complexes pour modifier et produire des protéines et des enzymes commerciales.

7.3.2 Entomotoxicité du culot des bouillons fermentés ainsi que des spores et des cristaux protéiques purifiés

Les culots des bouillons fermentés contiennent les spores et les CPI. Ils peuvent contenir des débris cellulaires et autres particules des boues non dissoutes sur lesquels des polymères extracellulaires insecticides (PVI, enzymes...) puissent être adsorbés. Suite à plusieurs lavages, les débris cellulaires et les particules des boues sont pour la plupart retirés du culot. Dans ce travail, peu de débris cellulaires ou particules de boues étaient observés au microscope à contraste d'interférence différentielle dans la suspension finale du culot. Il y avait beaucoup de spores et les cristaux pouvaient être distingués des particules de boues.

Le culot est obtenu par concentration des bouillons fermentés. En comparant avec la concentration en spores des bouillons fermentés utilisés pour obtenir les culots (Tableau 27), le nombre de spores augmente de 10 fois environ. Toutefois, cette observation est faite sous toute réserve puisque le nombre de spores n'est pas exact en raison de la possibilité de perdre des spores (ou de protéines insolubles) durant les multiples lavages. Il est impossible de connaître la quantité de spores (ou de protéines insolubles) perdues puisque le nombre de spores avant le premier lavage n'a pas été mesuré. Le facteur de dilution lors de la resuspension finale du culot peut aussi être différent d'un culot à l'autre. Le volume du culot avant la resuspension finale n'a pas été mesuré et il n'est pas

possible de déterminer avec précision le facteur de dilution pour chaque culot¹⁰². Dans ces circonstances, les entomotoxicités relatives au nombre de spores (*Tx/spores*) et à la teneur en protéines (*Tx/prot.soluble*) sont les meilleurs paramètres pour évaluer l'entomotoxicité du culot. Cela s'applique également aux entomotoxicités des spores et des cristaux purifiés.

La considération suivante a été prise en compte pour l'interprétation des résultats : l'entomotoxicité du culot correspond à l'effet synergique de la spore sur l'entomotoxicité du cristal. Effectivement, en corroborant les entomotoxicités des culots avec celles des spores et des cristaux purifiés, il est possible de confirmer l'importance des spores (ou des CPI) sur l'entomotoxicité observée.

Les prochaines sous-sections discutent de la synergie spore-CPI dans les boues et le milieu soja ainsi que des entomotoxicités relatives aux spores et aux cristaux purifiés.

7.3.2.1 Spores et cristaux produits dans le milieu soja

L'effet synergique des spores sur l'entomotoxicité des cristaux est mis en évidence avec l'augmentation substantielle du ratio *Tx/prot.solubles* du culot du milieu soja (40 UI/mg prot.solubles) par rapport à celui des CPI purifiés (7,6 UI/mg prot.solubles), soit 5,5 fois plus élevé¹⁰³. Des auteurs ont déjà constaté que les spores augmentaient considérablement l'entomotoxicité (section 2.1.3.2). Des augmentations plus importantes sont reportées dans la littérature, mais l'entomotoxicité a été testée sur des insectes différents et les substrats de fermentation étaient différents. Le degré de la synergie des spores sur l'entomotoxicité des cristaux dépend non seulement des insectes cibles et de la quantité ingérée, mais aussi de leurs fonctionnalités qui peuvent varier selon les milieux de culture (voir les prochaines sous-sections). Selon Fast (1977), les spores de Bt jouent un faible rôle dans l'entomotoxicité envers *C. fumiferana* qui s'apparente à l'insecte testé dans cette expérience, soit *C. occidentalis*.

7.3.2.2 Spores et cristaux produits dans les boues mixtes

Les spores purifiées des BEM sont plus entomotoxiques (0,2 UI/1x10³ spores) en comparaison avec celles produites dans le milieu soja (0,073 UI/1x10³ spores) et dans les BES (0,098

¹⁰² Cela s'applique aussi à la teneur des protéines contenues dans le culot (CPI et autres protéines insolubles). Elle est inférieure à celle des surnageants malgré leur concentration par centrifugation. Comme des protéines peuvent avoir été perdues lors des lavages du culot et que le facteur de dilution lors de la resuspension finale n'a pas été noté, il est impossible de connaître la teneur exacte de CPI dans chacun des culots.

¹⁰³ Rappelons que la teneur en protéines utilisée pour le calcul du ratio *Tx/prot.solubles* des culots correspond aux CPI ou autres protéines préalablement dissoutes avant l'analyse de leur contenu.

UI/1x10³ spores). Cela suggère que le substrat de fermentation ait un impact sur les fonctionnalités des spores. Dans le cas des BEM, elles offrent possiblement des conditions favorisant la maturité de la spore et/ou l'insertion de delta-endotoxines dans ses couches protéiques.

Les spores augmentent considérablement le potentiel insecticide des CPI contenus dans le culot des BEM non traitées (57,5 UI/mg prot.solubles dans le culot vis-à-vis 19,8 UI/mg prot.solubles pour les cristaux purifiés), mais leur effet est moins importante par rapport au milieu soja (2,9 fois vis-à-vis 5,5 fois plus élevé). La synergie CPI-spores semble moins importante dans les BEM bien que les spores soient plus entomotoxiques. Les fonctionnalités des CPI ont possiblement été modifiées. Leur ratio *Tx/prot.soluble* est d'ailleurs plus élevé que celui observé dans le milieu soja. Leurs effets létaux envers les larves ne requièrent pas autant de spores pour se manifester.

Le culot des BEM traitées a un rapport *Tx/prot.solubles* inférieur aux BEM non traitées et équivalent au milieu soja. La synergie spore-cristal diminue et les CPI semblent moins toxiques. L'hydrolyse thermo-alkaline des BEM modifie la composition du milieu et cela peut influencer la synergie spore-CPI et les fonctionnalités des CPI. Le même phénomène est observé dans le culot des BES hydrolysées. Il est cependant impossible de vérifier si les spores ou les cristaux purifiés sont plus ou moins entomotoxiques dans les boues hydrolysées car aucun test n'a été fait. Les éléments entomotoxiques des culots ont peut-être un pouvoir entomotoxique plus grand en présence des métabolites secondaires insecticides retirés avec le surnageant.

7.3.2.3 Spores et cristaux produits dans les boues secondaires

Un faible ratio *Tx/spores* est observé dans le culot des BES non hydrolysées (0,008 UI/1x10³ spores). Il est légèrement plus élevé que les culots du milieu soja. Selon le ratio *Tx/spores* des spores purifiées des BES (0,098 UI/1x10³ spores), les spores seraient plus entomotoxiques que celles produites dans le milieu soja (0,073 UI/1x10³ spores). Comme les BEM, les BES offrent des conditions favorisant la maturité de la spore et/ou l'insertion d'éléments entomotoxiques dans ses couches protéiques.

La synergie de la spore sur l'entomotoxicité des cristaux des BES est importante car le ratio *Tx/prot.solubles* du culot est plus élevé (55,6 UI/mg prot.solubles) que celui des cristaux en l'absence des spores (27,3 UI/mg prot.solubles), soit 1,7 fois supérieur. Le fort ratio *Tx/prot.solubles* du culot suggère également que les CPI soient plus entomotoxiques. Effectivement, le ratio *Tx/prot.solubles* des CPI produits dans les BES (27,3 UI/mg prot.solubles) indique qu'ils sont plus entomotoxiques que ceux produits dans le milieu soja (7,6 UI/mg

prot.solubles) ou dans les BEM (19,8 UI/mg prot.solubles). Les hypothèses énumérées dans le Tableau 31 peuvent expliquer cette observation.

Selon le ratio *Tx/spores* du culot, l'hydrolyse thermo-alcaline des BES semble diminuer le pouvoir insecticide de la spore. La synergie des spores avec les cristaux diminue par rapport aux BES non hydrolysées. Elle est tout de même plus élevée que celle du milieu soja. Cependant, il est impossible d'évaluer le degré de l'augmentation de l'entomotoxicité des cristaux par les spores puisque les cristaux purifiés des BES hydrolysées n'ont pas été analysés. Le fort ratio *Tx/prot.solubles* et le faible ratio *Tx/spores* suggèrent néanmoins que les cristaux sont plus performants en terme de pouvoir insecticide.

7.3.2.4 Importance des nouvelles fonctionnalités des spores et des cristaux de Bt produits dans les boues d'épuration

Les résultats de cette partie du travail montrent que les boues stimulent la production de spores et de CPI plus performants en terme d'entomotoxicité. Les boues modifient les fonctionnalités des spores et des CPI dont leur activité insecticide et leur synergie. Il devient alors intéressant d'explorer le potentiel des boues d'épuration et autres biomasses résiduelles comme milieu de culture complexe et économique pour obtenir des produits biologiques aux fonctionnalités accrues. Par exemple, des études sur le contenu en delta-endotoxines des CPI produits dans les boues indiqueraient peut-être qu'ils contiennent un plus fort pourcentage de delta-endotoxines que ceux produits dans le milieu soja.

Finalement, il serait intéressant dans des travaux ultérieurs de réaliser des tests d'entomotoxicité sur des échantillons purifiés de spores et de CPI produites dans les boues hydrolysées et de vérifier si elles améliorent les fonctionnalités des produits microbiens de Bt. Les traitements des boues et autres biomasses résiduelles pourraient alors devenir une solution aux recherches laborieuses en fermentation industrielle, en génie des protéines et en enzymologie pour accroître les rendements des procédés biologiques.

CONCLUSIONS

Ce travail a permis de développer une stratégie utilisant les propriétés nutritives intrinsèques des boues d'épuration pour accroître considérablement le rendement de *Bacillus thuringiensis* dans les boues d'épuration. L'hydrolyse alcaline, l'hydrolyse thermo-alcaline et l'hydrolyse alcaline suivie d'une oxydation partielle des boues d'épuration constituent une stratégie qui augmente l'entomotoxicité, le nombre de spores produites et/ou l'activité protéolytique de Btk HD-1 dans les boues. La stratégie a été optimisée et testée en fioles Erlenmeyer avec les boues mixtes et secondaires. Elle a aussi été éprouvée avec les boues secondaires dans un volume de travail de 10 litres.

Les conclusions tirées des résultats de ce travail sont les suivantes :

- L'hydrolyse alcaline et l'hydrolyse thermo-alcaline sont deux techniques de traitement qui accroissent le rendement de Btk HD-1 cultivée dans les boues d'épuration municipales en termes de spores produites et d'entomotoxicité. Elles permettent également d'utiliser une plus grande concentration de MES pour la culture de Btk HD-1 dans les boues ;
- La combinaison de l'hydrolyse thermo-alcaline avec l'oxydation partielle au H₂O₂ est une nouvelle technique de traitement des boues qui accroît le rendement de Btk HD-1 cultivée dans les boues d'épuration municipales en termes de spores produites, d'entomotoxicité et d'activité protéolytique. Elle permet aussi d'utiliser une plus grande concentration de MES pour la culture de Btk HD-1 dans les boues ;
- Les boues d'épuration municipales, en tant que substrat de fermentation, stimulent la formation de spores, de cristaux protéiques insecticides et de métabolites insecticides solubles de Btk HD-1 qui sont plus fonctionnels en terme d'entomotoxicité. L'hydrolyse thermo-alcaline des boues stimule particulièrement la formation de métabolites insecticides solubles de Btk HD-1 plus performants en terme d'entomotoxicité.

Les résultats n'ont pas permis de vérifier si les boues d'épuration municipales (traitées ou non), en tant que substrat de fermentation, entraînent une surproduction de cristaux protéiques insecticides et d'autres éléments entomotoxiques de Bt var. *kurstaki* (enzymes, protéines insecticides végétatives, autres protéines connues ou inconnues). De plus, il n'était possible de vérifier si les

traitements appliqués sur les boues stimulent la formation de spores et de CPI plus performants en terme d'entomotoxicité.

Les conclusions spécifiques aux effets des traitements sur les caractéristiques des boues en relation avec le rendement de Btk HD-1 sont les suivantes :

- La solubilisation du carbone organique et des protéines accroît le rendement de Bt dans les boues ;
- Une diminution de viscosité suite au traitement des boues accroît le rendement de Btk HD-1, spécialement lorsque la concentration en carbone organique dissous et le contenu en protéines solubles augmentent ;
- Le sodium, ajouté sous forme de NaOH lors des traitements alcalin ou thermo-alcalin des boues, contribue à augmenter le rendement de Btk HD-1 en terme d'entomotoxicité.

En ce qui concerne la partie statistique de ce travail, le PCC et la MRS sont deux méthodes statistiques expérimentales applicables à l'optimisation des traitements des boues utilisées comme substrat de fermentation. Elles permettent d'explorer des intervalles précises de valeurs pour chaque variable indépendante et d'estimer leurs effets sur la réponse de la variable dépendante. Elles permettent de minimiser le nombre d'expériences à réaliser tout en obtenant une bonne reproductibilité des résultats. Dans ce travail, la MRS génère des modèles polynomiaux pour prédire la réponse de la variable dépendante selon des valeurs attribuées aux variables indépendantes des traitements. Cependant, trois des cinq modèles développés permet de prédire adéquatement la réponse après les avoir vérifiés en fioles Erlenmeyer.

Finalement, les conclusions spécifiques au milieu de culture utilisé pour la production de Btk HD-1 sont les suivantes :

- Les boues secondaires, hydrolysées ou non hydrolysées, permettent d'obtenir des entomotoxicités spécifiques (par spores ou protéines solubles) plus élevées que dans le milieu soja ;
- Les boues secondaires ayant subies une hydrolyse thermo-alcaline et une oxydation partielle augmentent le taux de croissance spécifique de Btk HD-1 par rapport à celui observé dans le milieu soja et obtiennent les plus fortes entomotoxicités spécifiques ;

- Les spores de Btk HD-1 produites dans les boues d'épuration mixtes sont plus entomotoxiques que celles produites dans les boues secondaires et le milieu soja ;
- Les cristaux protéiques insecticides de Btk HD-1 produits dans les boues secondaires sont plus entomotoxiques que ceux produits dans les boues mixtes et le milieu soja.

La stratégie développée dans ce travail promeut l'utilisation des boues d'épuration municipales et autres biomasses résiduelles comme matière première pour la formation de PVA. Cette stratégie innovatrice instaurera une nouvelle ère dans le domaine des biotransformations. Les conclusions tirées de ce travail démontrent bien le potentiel scientifique et socio-économique extraordinaire de l'approche préconisée et ouvrent la porte à plusieurs recherches dans les secteurs de la fermentation industrielle, du génie des protéines et de l'enzymologie. L'approche est d'ailleurs à l'origine d'un important projet subventionné par la Fondation Canadienne sur l'Innovation (Laboratoire de recherche et développement sur la production à valeur ajoutée en utilisant des rejets urbains, industriels et agricoles comme substrat de base) dans lequel il est prévu de tester les traitements des boues à une échelle pré-industrielle de 1000 litres. L'approche est également à l'origine de la *Chaire de recherche du Canada sur la bioconversion des eaux usées et des boues d'épuration* octroyée en 2004 au professeur Tyagi dont le programme de recherche portera entre autres sur le traitement des boues et l'étude approfondie des nouvelles fonctionnalités des produits microbiens fabriqués dans les eaux usées et les boues. Il apparaît clairement que les boues d'épuration présentent un potentiel économique et une valeur nutritive intrinsèque largement sous-estimés et qu'il est maintenant juste de les considérer comme une réserve mondiale de ressources alternatives.



RECOMMANDATIONS

Dans ce travail, plusieurs phénomènes ou résultats restent inexpliqués en raison des données insuffisantes. De plus, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour supporter et confirmer d'autres hypothèses émises dans ce travail. Des recommandations pour de futurs travaux sont énumérées dans le Tableau 35.

Tableau 35 Quelques recommandations pour les recherches à venir sur le traitement des boues et leur bioconversion en produits à valeur ajoutée.

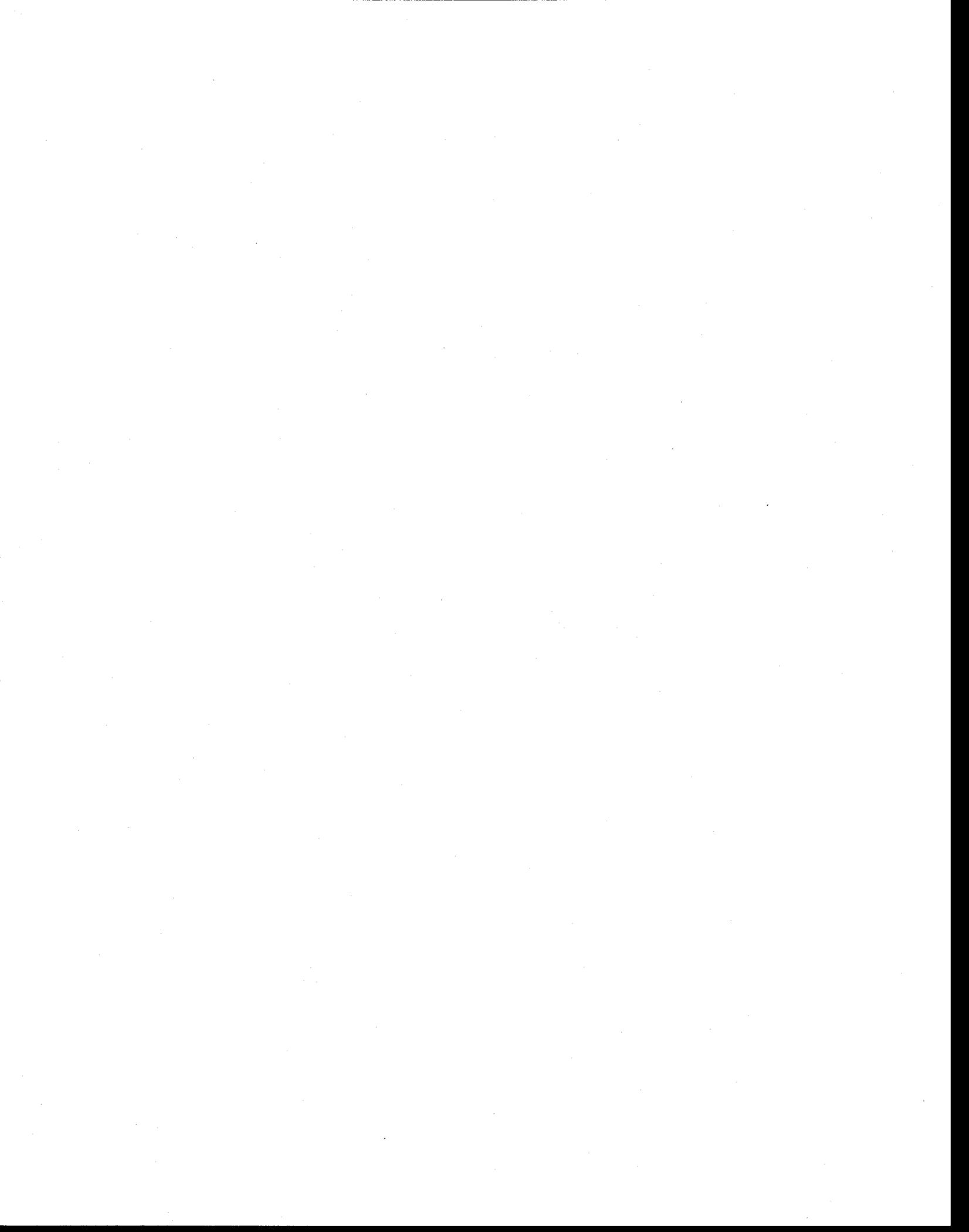
Recommandations	Explications
Analyser la composition de la boue après une hydrolyse thermo-alcaline par injection de vapeur	Le type d'énergie chimique utilisée pour l'hydrolyse thermo-alcaline des boues influence le rendement de Bt en terme de spores produites. De plus, l'hydrolyse thermo-alcaline par injection de vapeur est privilégiée aux micro-ondes en raison de son coût et de son potentiel à remplacer l'étape de la stérilisation lors de la production de Bt. Il serait souhaitable d'analyser les caractéristiques des boues après une hydrolyse thermo-alcaline par injection de vapeur pour déterminer les effets de ce traitement sur les boues et sur Bt.
Explorer les mécanismes de l'hydrolyse et de l'oxydation partielle sur les boues	Les réactions d'hydrolyse et d'oxydation partielle sur les boues sont bien documentées dans la littérature, mais elles ne considèrent pas leur utilisation subséquente comme milieu de fermentation. Chaque microorganisme requiert des conditions de culture spécifiques. Si les boues hydrolysées sont utilisées comme substrat, elles doivent détenir des conditions de culture adéquates. Par exemple, les acides aminés stimulent ou inhibent les processus de sporulation et de formation des CPI. Il est possible que certains traitements libèrent plus d'acides aminés que d'autres. Comme les boues stimulent la production de spores, de CPI et d'autres métabolites insecticides, il serait intéressant de vérifier si les acides aminés jouent un rôle important. D'autres caractéristiques initiales des boues peuvent influencer les effets des traitements comme par exemple la teneur en MES. Il serait aussi intéressant d'évaluer leur impact sur les effets des traitements.
Intégrer l'hydrolyse thermo-alcaline à la phase de stérilisation des boues	La stratégie développée dans ce travail est une nouvelle étape de traitement en amont du procédé BT-INRS ou autre procédé basé sur des boues d'épuration. Dans le cas de l'hydrolyse thermo-alcaline, les coûts inhérents à cette stratégie se traduisent par l'acquisition et l'entretien d'un hydrolyseur ainsi que la consommation d'énergie. L'intégration de l'hydrolyse à l'étape de la stérilisation serait un moyen de réduire les coûts associés à la stratégie. Il serait intéressant de tester l'effet de l'hydrolyse thermo-alcaline des boues sur le rendement de Bt en excluant l'étape conventionnelle de la stérilisation. Le transfert des boues de l'hydrolyseur au fermenteur devra bien entendu s'effectuer de façon aseptique.
Étudier l'hydrolyse alcaline à des températures intermédiaires	Dans ce travail, l'hydrolyse alcaline des boues n'a pas été explorée à des températures se situant entre 32,5°C et 120°C. Il serait intéressant d'étudier l'hydrolyse alcaline des boues à cet intervalle de température et vérifier l'effet sur le rendement de Btk.
Effets de la stérilisation sur les caractéristiques des boues traitées ou non traitées	L'effet de la stérilisation sur les boues est peu documenté. Ce travail démontre bien la susceptibilité des boues aux réactions d'hydrolyse et d'oxydation partielle. Ces réactions peuvent survenir durant la stérilisation. Bien que les traitements puissent modifier adéquatement les boues pour supporter la croissance bactérienne, la stérilisation subséquente du milieu pour la fermentation peut atténuer les effets favorables des traitements. Cela est apparemment le cas pour l'hydrolyse thermique étudiée dans ce travail. Dans le cadre du procédé BT-INRS, il est recommandé de réaliser des recherches sur ce sujet.

Tableau 33 Quelques recommandations pour les recherches à venir sur le traitement des boues et leur bioconversion en produits à valeur ajoutée (suite).

Recommandations	Explications
Poursuivre le travail d'optimisation	La MRS n'est pas parvenue à détecter avec exactitude les valeurs optimales de certains traitements. Il serait souhaitable de poursuivre l'optimisation des traitements en utilisant les présents résultats pour déterminer de nouvelles valeurs optimales provisoires et former des PCC dont la région expérimentale contiendrait les valeurs optimales recherchées.
Variabilité des caractéristiques des boues	Bien que des données soient disponibles sur la variabilité des boues, il serait souhaitable de continuer les recherches sur ce sujet pour monter une base de données qui permettra de maîtriser ce risque technologique. Cela est particulièrement important pour les productions de PVA dont la demande est forte et constante. Dans le cas du procédé BT-INRS, l'élaboration d'une stratégie de production basée sur les douze mois de l'année semble pour l'instant une des solutions au problème de variabilité des boues.
Adsorption des spores et des métabolites insecticides de Bt sur la mousse	Il est recommandé de vérifier l'impact de l'adsorption des spores et des métabolites insecticides sur la mousse vis-à-vis le rendement du procédé BT-INRS (spores, entomotoxicité, activité protéolytique).
Perte en spores et en protéines lors des lavages des culots ou autres suspensions	Pour des travaux ultérieurs sur le culot des bouillons fermentés, il serait souhaitable de connaître les quantités de spores et de protéines insolubles perdues durant les lavages. L'analyse des teneurs en spores et en protéines avant le premier lavage est de mise.
Entomotoxicité et composition du surnageant	Ce travail montre que le surnageant contient des métabolites solubles au pouvoir entomotoxique non négligeable. Il est recommandé d'analyser le contenu du surnageant en déterminant la masse moléculaire de(s) protéines dominantes pour estimer la quantité de protéines insecticides telles que les PIV. Il est également recommandé d'analyser le surnageant pour vérifier la présence d'exotoxines. Finalement, il serait intéressant d'évaluer l'apport des protéases et des chitinases à l'entomotoxicité en mesurant l'activité enzymatique ou en utilisant des inhibiteurs enzymatiques.
Récupération du surnageant	Il est recommandé de mener des études sur la récupération des protéases ou autres métabolites solubles d'intérêt commercial (ex. : antibiotiques) dans le surnageant des boues fermentées par Bt. Il est recommandé aussi d'étudier l'ajout du surnageant lors la formulation du bio-insecticide et vérifier s'il accroît l'entomotoxicité.
Entomotoxicité des spores et des cristaux purifiés produits dans les boues traitées	Il est recommandé de répéter les expériences sur les surnageants, les culots, les spores et les CPI purifiées des boues non hydrolysées sur des suspensions de boues traitées, spécialement celles ayant subies une hydrolyse alcaline, une hydrolyse thermo-alcaline et un traitement thermo-oxydant.
Composition en delta-endotoxine des spores et des cristaux purifiés	Il est recommandé de vérifier le contenu en delta-endotoxine des spores et des CPI produits dans les boues d'épuration.
Fonctionnalités des spores, des protéases et des CPI	Il est recommandé de vérifier les fonctionnalités des spores (thermostabilité, susceptibilité vis-à-vis les germinants, viabilité...), des protéases (thermostabilité, résistance aux inhibiteurs et à des valeurs élevées de pH alcalin...) et des CPI (thermostabilité, résistance aux rayons ultra-violets...) produites dans les boues d'épuration.
Analyse sur les plasmides et leur expression génétique	Il est recommandé de vérifier s'il y a surexpression de gènes sur les plasmides ou la présence de plusieurs copies d'un plasmide dans la même cellule.
Combiner la stratégie à d'autres stratégies existantes	Il est recommandé de combiner la stratégie développée à d'autres stratégies pour accroître davantage le rendement en entomotoxicité du procédé BT-INRS (ex. : croissance de nouvelles souches bactériennes de Bt isolées des boues d'épuration).
Analyse économique du procédé BT-INRS en incluant une étape de traitement en amont	Une analyse économique basée sur la publication de Rowe et Margaritis (2004) pourrait être réalisée pour vérifier si les coûts relatifs à l'ajout d'une étape d'hydrolyse sont compensés par les hausses de rendement et les économies faites sur la matière première.

Pour terminer, il est fortement recommandé d'utiliser les boues d'épuration traitées comme milieu de culture pour la production de PVA en utilisant des souches microbiennes industrielles ou nouvelles (ex. : isolées des boues d'épuration). Ce travail justifie l'ajout d'une étape de traitement en amont aux procédés développés (ou en voie de l'être). Parmi les trois techniques de traitement qui ont fait l'objet des travaux d'optimisation, il est recommandé d'accentuer les recherches sur l'hydrolyse thermo-alkaline des boues secondaires. Elle augmente considérablement le rendement du procédé BT-INRS en terme d'entomotoxicité, permet d'utiliser une grande concentration en MES et stimule la production de métabolites insecticides solubles. De plus, elle pourrait potentiellement remplacer la phase de stérilisation, ce qui minimiserait les coûts associés à l'ajout d'un traitement en amont.

Beaucoup de recherches ont été réalisées sur le traitement des boues d'épuration pour améliorer le rendement en méthane ou en AGV, mais aucune sur leur hydrolyse et/ou oxydation partielle en vue d'accroître le rendement en PVA spécifiques (et commerciaux) comme les agents de biocontrôle, les enzymes industrielles (carbohydrases, protéases, lipases, oxydases), les bio-inoculants, les bioplastiques/biopolymères, les biocombustibles, l'hydrogène et les biosurfactants. Ce travail ouvre ainsi la voie à des recherches innovatrices sur une vaste gamme de substrats économiques (eaux usées, boues d'épuration...), des souches conventionnelles (ou nouvelles) et des mécanismes novateurs (ex. : traitements) pour maximiser les rendements en PVA. À l'aube de la bio-économie, le potentiel scientifique et socio-économique d'une telle approche contribuera à l'essor de technologies environnementales qui déboucheront sur des créneaux et des marchés fructueux de l'industrie verte. Cette approche minimisera l'exploitation des ressources renouvelables et non renouvelables, et réduira l'utilisation des produits chimiques en instaurant une nouvelle industrie de produits biologiques basée sur des matériaux économiquement viables, le tout en respect avec le développement durable.



RÉFÉRENCES

- Abdel-Hammed (2001). Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal delta-endotoxin : mathematical modelling and scale-up studies. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 : 857-861.
- Adinarayana, K. et P. Ellaiah (2002). Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp.. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5 (3) : 272-278.
- Aesoy, A. et H. Odegaard (1994a). Nitrogen removal efficiency and capacity in biofilms with biologically hydrolysed sludge as a carbon source. *Water Sci. Technol.*, 30 (10-11) : 63-71.
- Aesoy, A. et H. Odegaard (1994b). Denitrification in biofilms with biologically hydrolysed sludge as carbon source. *Water Sci. Technol.*, 29 (6) : 93-100.
- Agaisse, H. et D. Lereclus (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.*, 177 : 6027-6032
- AGCan et CCNOPA (2001). *Cadre de discussion sur le développement d'un bio-industrie au Canada*. Agriculture et Agroalimentaire Canada et Conseil canadien des nouvelles utilisations des produits agricoles, Canada, 83 pages.
- Ahern, M., S. Verschueren et D. van Sinderen (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220 (1) : 127-131.
- Ahn, K.-H., K.Y. Park, S.K. Maeng, J.H. Hwang, J.W. Lee, K.-G. Song et S. Choi (2002). Ozonation of wastewater sludge for reduction and recycling. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 71-77.
- Aiba, S., A.E. Humphrey et N.F. Millis (1973). *Biochemical Engineering*. Academic Press, 2^{ie}me édition, New York, États-Unis.
- Alves, L.F.A., S.B. Alves, R.M. Pereira et D.M.F. Capalbo (1997). Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* grown in alternative media. *Biocontrol Sci. Technol.*, 7 : 377-383.
- Andreasen, K., G. Petersen, H. Thomsen et R. Strube (1997). Reduction of nutrient emission by sludge hydrolysis. *Water Sci. Technol.*, 35 (10) : 79-85.
- Anderson, N.J., D.R. Dixon, P.J. Harbour et P.J. Scales (2002). Complete characterisation of thermally treated sludges. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 51-54.
- Anawar, A. et M. Sallemudin (1997). Alkaline proteases: A review. *Bioressource Technol.*, 64 : 175-183.
- Angus, T.A. (1959). The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. *World Rev. Pest. Cont.*, 7 : 11-26.

- APHA, AWWA et WPCF (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters*, 17th edition. American Public Health Association, Washington, États-Unis.
- Aravinthan, V., T. Mino, S. Takizawa, H. Satoh et T. Matsuo (2001). Sludge hydrolysate as a carbon source for denitrification. *Water Sci. Technol.*, 43 (1) : 191-199.
- Ariff, A.B., M. Rosfarizan, M.A. Sobri et M.I.A. Karim (2001). Biological Treatment of Fishery Washing Water using *Bacillus sphaericus* Coupled with Production of Spores that are Toxic to Mosquito Larvae. *Env. Technol.*, 22 (6) : 697-704.
- Aronson, A.I., D.J. Tyrell, P.C. Fitz-James et L.A. Bulla (1982). Relationship of the syntheses of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.*, 151 : 399-410.
- Aronson, A.I. (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis* : insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.*, 7 (4) : 489-496.
- Aronson, A.I. et Y. Shai (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective : unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.*, 195 : 1-8.
- Asano, S., L.S. Indrasith et H. Hori (1995). Synergism in larvicidal activity between supernatant and pellet from *Bacillus thuringiensis* culture. *Appl. Entomol. Zool.*, 30 (1) : 153-158.
- Asano, S., K. Ogiwara, L.S. Indrasith, M. Takahashi, N. Suzuki et H. Hori (2000). Synergism of the spore on insecticidal activity of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Yponomeutidae) in not observed at late stage bioassay. *Appl. Entomol. Zool.*, 35 (4) : 583-590.
- Atkinson, B. et F. Mavituna (1991). *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. Stockton Press, New York, É.-U., 1271 pages.
- Avignone-Rossa, C. et C.F. Mignone (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. *Mol. Biotechnol.*, 4 : 55-71.
- Avignone-Rossa, C. et C.F. Mignone (1993). Delta-endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.*, 15 (3) : 295-300.
- Avignone-Rossa, C. et C.F. Mignone (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and (-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 : 301-304.
- Bailey, J.E. et D.F. Ollis (1986). *Biochemical engineering fundamentals, second edition*. McGraw-Hill Inc., Montréal, Canada, 984 pages.
- Banerjee-Bhatnagar, N. (1998). Modulation of *cryIVA* toxin protein expression by glucose in *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, 252 : 402-406.
- Benmoussa, H., R.D. Tyagi et P.G.C. Campbell (1997). Simultaneous sewage sludge digestion and metal leaching using an internal loop reactor. *Water Res.*, 31 (10) : 2638-2654.
- Banik, S., S. Bandyopadhyay et S. Ganguly (2003). Bioeffects of microwave—a brief review. *Bioresource Technol.*, 87 : 155-159

- Barjenbruch, M., H. Hoffmann, O. Kopplow et J. Tranckner (2000). Minimizing of foaming in digesters by pre-treatment of the surplus-sludge. *Water Sci. Technol.*, 42 (9) : 235-241.
- Barjenbruch, M. et O. Kopplow (2003). Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Adv. Env. Res.*, 7 : 715-720.
- Barlinghaug, J. et H. Odegaard (1996). Thermal hydrolysis for the production of carbon source for denitrification. *Water Sci. Technol.*, 34 (1-2) : 371-378.
- Barnabé, S., A.S. Vidyarthi, R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2001). Methods to improve entomotoxicity of biopesticides based *Bacillus thuringiensis*. Déclaration de savoir-faire soumise le 15-10-01, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada, 13 pages.
- Barnabé, S., J.-L. Sasseville, R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2004). Eaux usées, boues d'épuration et biomasses résiduelles, de matières tertiaires à matières premières : comment intégrer la bio-industrie émergente et connaître le succès ? Salon des technologies environnementales du Québec 2004, Réseau Environnement, 17-19 mars, Palais des congrès de Québec, Québec, Canada.
- Barnabé, S., J.-L. Sasseville, R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2003). Les eaux usées et les résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? *Vecteur Environnement*, 36 (2) : 50-62.
- Barnabé, S. (2000). *Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides : induction abiotique de la sporulation chez Bacillus thuringiensis*. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Eau, Québec, Canada, 157 pages.
- Bhattacharya, M., B.A. Plantz, J.D. Swanson-Kobler et K.W. Nickerson (1993) Nonenzymatic glycosylation of Lepidoptera-active *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2666-2672.
- Baum, J.A. et T. Malvar (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, 18 (1) : 1-12.
- Beg, Q.K., V. Sahai et R. Gupta (2003). Statistical media optimization and alkaline production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Proc. Biochem.*, 39 : 203-209.
- Benoît, T.G., G.R. Wilson et C.L. Baugh (1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10 : 15-18.
- Ben Rebah, F. (2001). *Utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture pour la production d'inoculants à base de Rhizobium*. Thèse de doctorat, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada, 239 pages.
- Bhattacharya, P.R. (2000). Hyper-production of insecticidal crystal protein (delta-endotoxin) by *Bacillus thuringiensis* var. israelensis is not related to sporulation-specific biochemical functions. *Current Microbiol.*, 41 : 187-191.
- Bernhard, K. et R. Utz (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* for experimental and commercial uses. Dans : Entwistle, P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey et S. Higgs (éds), *The Bacillus Thuringiensis, An Environment Biopesticide, Theory & Practice*, Johns Wiley & Sons Ltd, New York, États-Unis, p. 256-267.

- Bocchini, D.A., H.F. Alves-Prado, L.C. Baida, I.C. Roberto, E. Gomes, R. Da Silva (2002). Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochem.*, 38 : 727-731.
- Bourque, S.N., D.F. Perry D.F. et M.C. Lavoie (1992). Growth inhibition of of selected fungal and bacterial species isolated from the forest environment by *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki*. *Microbios*, 69 : 223-232.
- Bowers, A.R., P. Gaddipati, W.W. Eckenfelder et R.M. Monsen (1989). Treatment of toxic or refractory wastewaters with hydrogen peroxide. *Water Sci. Technol.*, 21: 477-486.
- Box, G.E.P. et K.B. Wilson (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc. B*, 13 : 1.
- Box, G.E.P., W.G. Hunter et J.S. Hunter (1978). *Statistics for experimenters : An introduction to design, data analysis and model building*. John Wiley & Sons, New York, États-Unis.
- Bradford, M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248-254.
- Brar, S. (2004). Études rhéologiques de boues fermentées par *Bacillus thuringiensis* et développement de formulations aqueuses et sèches. Thèse de doctorat en voie de rédaction, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, Canada.
- Brar, S., M. Verma, S. Barnabé, R.D. Tyagi, J.R. Valéro et R. Surampali (2004). Rheological impact of Tween 80 in *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. Article soumis pour publication dans le journal *Biotechnology & Bioengineering*.
- Brooks, R.B. (1970). Heat treatment of sewage sludge. *Water Pollut. Control*, 69 (2) : 221-231.
- Brown, M.J. et J.N. Lester (1980). Comparaison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40 (2): 179-185.
- Brussock, S.M. et T.C. Currier (1990). Use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Dans : Hickie, L.A. (éd.), *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*, Oxford University Press, American Chemical Society, É.-U., p. 78-87.
- Bulla, L.A., L.I. Davidson, K.J. Kramer et B.L. Jones (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 91 (3) : 1123-1130.
- Bulla, L.A., D.B. Bechtel, K. J. Kramer, Y.I. Schethna, A.I. Aronson et P.C. Fitz-James (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 8 : 147-204.
- Bulla, L.A., K.J. Kramer, D.J. Cox, B.L. Jones, L.I. Davidson et G.L. Lookhart (1981). Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 6 (25): 3000-3004.
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial biopesticides : beneficial microorganismes, nematodes and seed treatments*. Kluwer Academic Publishers, Boston, É.-U., 412 pages.

- Burges, H.D., E.M. Thomson et R.A. Lactford (1976). Importance of spores and delta-endotoxin protein crystal of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. *J. Inv. Pathol.*, 27 : 87-94.
- Burkert, J.F.M., F. Maugeri et M.I. Rodrigues (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Bioresource Technol.*, 91 : 77-84.
- Camacho, P., S. Deleris, V. Geaugey, P. Ginestet et E. Paul (2002). A comparative study between mechanical, thermal and oxidative disintegration techniques of waste activated sludge. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 79-87.
- Campbell, H. W. (2000). Sludge management – futures issues and trends. *Water Sci. Technol.*, 41 (8): 1-8.
- Candas, M., O. Loseva, B. oppert, P. Kosaraju et L.A. Bulla (2002). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* – Alterations in the indianmeal moth larval gut genome. *Mol. Cell. Proteomics*, 2.1 : 19-28.
- Charbonneau, H., M. Hébert et A. Jaouich (2000). Portrait de la valorisation agricole des matières résiduelles fertilisantes au Québec. *Vecteur Environnement*, 33 (6) : 30-32, 49-55.
- Chen, Q.H., G.Q. He et A.M.A. Mokhtar (2002). Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. *Enz. Microbial Technol.*, 30 : 667-672.
- Chen, F.C., L.F. Shen, M.C. Tsai et K.F. Chak (2003). The ispA protease's involvement in the regulation of the sporulation process of *Bacillus thuringiensis* is revealed by proteomic analysis. *Biochem. Biophysical Res. Comm.*, 312 : 708-715.
- Chestukhina, G.G., I.A. Kostina, L.I. Kotova, T.S. Katrukha, S.P. Lyublinskaya et L.A. Stepanov (1978). Proteinases bound to crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry*, 43 : 681-686.
- Chiu, Y.-C., C.-N. Chang, J.-G. Lin et S.-J. Huang (1997). Alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, 36 (11) : 155-162.
- Converti, A., F. Drago, G. Ghiazza, M. D. Borghi et A. Macchiavello (1997). Co-digestion of municipal sewage sludges and pre-hydrolysed woody agricultural wastes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69 : 231-239.
- Copping, L.G. (1998). *The biopesticide manual, first edition*. The British Crop Protection Council, Surrey, Royaume-Uni, 333 pages.
- Copping, L.G. et J.J. Menn (2000). Biopesticides : a review of their action, application and efficacy. *Pest. Manag. Sci.*, 56: 651-676.
- Cooper, D. (1994). *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. *Agricul. Ecosyst. Env.*, 49 : 21-26.
- Couillard, D. et M. Chartier (1993). Influence des caractéristiques des boues digérées en aérobose sur la solubilisation biologique des métaux. *Can. J. Civ. Eng.*, 20 : 509-517.

- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. van Rie, D Lereclus, J. Baum et D.H. Dean (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3) : 807-813.
- Dale, B.E. (1999). Biobased industrial products : bioprocess engineering when cost really counts. *Biotechnol. prog.*, 15, 775-776.
- Dalhammar, G. et H. Steiner (1984). Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.*, 139(2) : 247-252.
- Daniels, R., J. Vanderleyden et J. Michiels (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28 : 261-289.
- Del Borgi, A., A. Converti, E. Palazzi et M.D. Borghi (1999). Hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste. *Bioprocess Eng.*, 20 : 553-560.
- Delgènes, J.P., V. penaud, M. Torrijos et R. Moletta (2000). Investigations on the changes in anaerobic biodegradability and biotoxicity of an industrial microbial biomass induced by a thermochemical pretreatment. *Water Sci. Technol.*, 41 (3) : 137-144.
- Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business : the economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.*, 18 : 499-514.
- Demain, A.L. et J.E. Davies (1999). *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, É.-U., 830 pages.
- Dentel, S.K. (1997). Evaluation and role of rheological properties in sludge management. *Wat. Sci. Tech.*, 36 (11) : 1-8.
- Dey, G., A. Mitra, R. Banerjee et B.R. Maiti (2001). Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, 7 : 227-231.
- Donavan, W.P., J.C. Donovan et J.T. Engleman (2001). Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *J. Inv Pathol.*, 78 : 45-51.
- Doss, V.A., K.A. Kumar, R. Jayakumar, et V. Sekar (2002). Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3A) of *Bacillus thuringiensis* in *Eschericia Coli*. *Prot. Expres. Purific.*, 26 : 82-88.
- Draper, N.R. et H. Smith (1998). *Applied regression analysis - 3th edition*. Marcel Dekker, New-York, États-Unis.
- Du, C. et K.W. Nickerson (1996). *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized CryIAc toxin: physiological and pathogenic consequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 3722-3726.

- Dubois, N.R. et D.H. Dean (1995). Synergism between Cry1A insecticidal crystal protein and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera : Lymantriidae) larvae. *Environ. Entomol.*, 24 : 1741-1747.
- Dulmage, H. T. (1970). Insecticidal activity of HD-1, a new isolates of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invert. Pathol.*, 15 : 232-239.
- Dulmage, H.T., O.P. Boening, C.S. Rehnborg et G.D. Hansen (1971). A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Inv. Pathol.*, 18: 240-245.
- Ellaiah, P., B. Srinivasulu et K. Adinarayana (2002). A review on microbial alkaline proteases. *J. Sci. Ind. Res.*, 61: 690-704.
- Erdinçler, A. et P.A. Vesilind (2000). Effect of sludge disruption on compactibility of biological sludges. *Water Sci. Technol.*, 42 (9) : 199-126.
- Espinasse, S., M. Gohar, J. Chaufaux, C. Buisson, S. Perchat et V. Sanchis (2002). Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (9) : 4182-4186.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig et M.G. Koziel (1996). *Vip3A*, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 5389-5394.
- Faloci, M.M., O.M. Yantoro, H.A. Marino, J.A. Arcas et R.J. Ertola (1990). Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 6 : 32-38.
- Farrera, R.R., F. Pérez-Guevara et M. de la Torre (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.
- Fast, P.G. (1972). The delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III : A rapid method for separating parasporal bodies from spores. *J. Inv. Pathol.*, 20 : 139-140.
- Fast, P.G. (1977). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : on the relative role of spores and crystals in toxicity to spruce budworm (Lepidoptera : Tortricidae). *Can. Entomol.*, 109 : 1515-1518.
- Faust, R.M. et L.A. Bulla (1982). Bacteria and their toxins as insecticides. Dans : Kurstak, E. (éd.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, É.-U., p.75-207.
- Faust, R.M., A. Kazunori, A.H. Gary, T. Itzuka, L.A. Bulla et C.L. Meyers (1983). Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid.*, 9 : 98-103.
- Feldmann, F., A. Dulleman, et C. Waalwijk (1995). Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2601-2605.
- Foster, J.W. et F. Heiligman (1949). Biochemical factors influencing sporulation in a strain of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 57 : 639-646.

- Gallert, C. et J. Winter (2002). Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften*, 89 : 483-496.
- Gerngross, T.U. (1999). Can biotechnology move us toward a sustainable society ? *Nature biotech.*, 17 : 541-544.
- Gerhardt, P. et S.W. Drew (1993). Liquid culture. Dans : Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood et N.R. Krieg (éds), *Methods for general and molecular bacteriology*, ASM press, section II, p. 224-247.
- Gould, G. W. (1969). *The bacterial spore*. Academic Press, New York, É.-U., 724 pages.
- Gould, F., A. Anderson. D. Landis et H.V. Mellaert (1991). Feeding behavior and growth of *Heliothis virescens* larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulation or endotoxins. *Entomol. Exp. Appl.*, 58 : 199-210.
- Grandvalet, C., M. Gominet et D. Lereclus (2001) Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation. *Microbiol.*, 147 : 1805-1813.
- Halvorson, H.G. (1957). Rapid and simultaneous sporulation. *J. appl. Bact.*, 20 (3) : 305-314.
- Hannay, C.L. et P. Fitz-James (1955). The protein crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*. *Can J. Microbiol.*, 1 : 694-710.
- Hardwick, W.A. et J.W. Foster (1969). On the nature of sporogenesis in some aerobic bacteria. *J. Gen. Physiol.*, 35 : 907-927.
- Hasagawa, S., N. Shiota, K. Katsura et A. Akashi (2000). Solubilization of organic sludge by thermophilic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, 41 (3) : 163-169.
- Häse, C.C., N.D. Fedorava, M.Y. Galperin et P.A. Diborv (2001). Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (3) : 353-370.
- Hatziconstantinou, G.J., Yannakopoulos et A. Andreadakis (1996). Primary sludge hydrolysis for biological nutrient removal. *Water Sci. Technol.*, 34 (1-2) : 417-423.
- Haug, R.T. (1977). Sludge processing to optimize digestibility and energy production. *J. WPCF*, juillet : 1713 - 1721.
- Haug, R.T., D.C. Stuckey, I.M. Gosset et P.I. McCarthy (1978). Effect of thermal pretreatment on digestibility and dewaterability of organic sludges. *J. Water. Pollut. Cont. Fed.*, 50 (1) : 73-85.
- Haug, R.T., T.J. LeBrun et L.D. Tortorici (1983). Thermal pre-treatment of sludges - a field demonstration. *J. WPCF*, 55 (1) : 23-24.
- Hernandez, C.S., C. Martinez, M. Porcar, P. Caballero et J. Ferre (2003) Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *J. Inv. Pathol.*, 82 : 57-62.

- Hills, D.J. et K. Nakano (1984). Effects of particule size on anerobic digestion of tomato solid wastes. *Agricul. Wastes*, 10 : 285-295.
- Höfte, H. et H.R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. rev.*, 53 (2) : 242-255.
- Hotha, S. et R. M. Banik (1997). Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69 : 5-10.
- Hsu, Y.-L. et W.-T. Wu (2002). A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochem. Eng. J.*, 11 : 123-130.
- Huang, T.K, P.M. Wang et W.T. Wu (2001). Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an airlift reactor with wire mesh draft tubes. *Biochem. Eng. J.*, 7 : 35-39.
- Huber, H.E., P. Lüthy, H.R. Ebersold et J.L. Cordier (1981). The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* : size, linkage and toxicity. *Arch. Microbiol.*, 129 : 14-18.
- Huber, H. E. et P. Lüthy (1987). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : composition and activation. Dans : Davidson, E. W. (éd.), *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, Allenheld, Osmun, p. 209-234.
- Içgen, Y., B. Içgen et G. Özcengiz (2002a). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : I. Effects of mineral elements and pH. *Res. Microbiol.*, 153 : 605-609.
- Içgen, Y., B. Içgen et G. Özcengiz (2002b). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res. Microbiol.*, 153 : 605-609.
- Ismail, A., M. Linder et M. Ghoul (1999). Optimization of butylgalactoside synthesis by β -galactosidase form *Aspergillus oryzae*. *Enz. Microbiol. Technol.*, 25 : 208-213.
- Industrie Canada (1998). *SCB en direct – Contexte et enjeux stratégiques : secteur forestier*. Groupe de travail - Stratégie Canadienne en matière de biotechnologie, Industrie Canada, Canada, <http://strategis.ic.gc.ca> .
- Ito, A., J. Kusanagi, T. Matsukura, J. Aizawa et T. Umita (2002). Relationship between partition of heavy metals in sewage sludge and elution of heavy metals. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 25-32.
- Jenkins, R.L., Scheybeler, B. J., Smith, M.L., Baird, R., M.P. Lo et R.T. Haug (1981). Metals removal and recovery from municipal sludge. *J. WPCF*, 53 (1) : 25-32.
- Jeworski, M. et E. Heinzle (2000). Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 6 : 163-196.
- Johnson, D.E., B. Oppert, W.H. McGaughey (1998). Spore coat synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth larvae. *Curr. Microbiol.*, 36 : 278-282.
- K.-B. Joung et J.-C. Côté (2000). A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Bulletin technique no.29, Centre de recherche et de développement en horticulture, Ressources Naturelles Canada, 16 pages.

- Karlsson, I. et J. Goransson (1993). Thermic sludge treatment. *Water Sci. Technol.*, 27 (5-6): 449-456.
- Kaylen, M., D.L. Van Dyne, Y.-S. Choi et M. Blase (2000). Economic feasibility of producing ethanol from lignocellulosic feedstocks. *Bioresource Technol.*, 72 : 19-32.
- Kepp, U., I. Machenbach, N. Weisz et O.E. Solheim (2000). Enhanced stabilization of sewage sludge through thermal hydrolysis – three years of experience at full scale plant. *Water Sci Technol.*, 42 (9) : 86-89.
- Kennedy, M. et D. Krouse (1999). Strategies for improving fermentation medium performance : a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23 : 456-475.
- Kim, Y.-K. et I.-R. Huh (1997). Enhancing biological treatability of landfill leachate by chemical oxidation. *Env. Eng. Sci.*, 14 (1): 73-79.
- Kim, J.S., Y.Y. Lee et S.C. Park (2000). Pretreatment of wastepaper and pulp mill sludge by aqueous ammonia and hydrogen peroxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84-86 : 129-139.
- Kiyohiko, N., N. Akakura, T. Adachi et T. Akiyama (1999). Use of wastewater sludge as a raw material for production of L-lactic acid. *Environ. Sci. Technol.*, 33 : 198-200.
- Katsiris, N. et A. Kouzeli-Katsiri (1987). Bound water content of biological sludges in relation to filtration and dewatering. *Water Res.*, 21 (11): 1319-1327.
- Krofta, M. (1991). Municipal sludge stabilization and disinfection with ozone/ozone treatment. Dans : WPCF (éd.), *WPCF Speciality Conference -The future of residuals management after 1991*, Caroline du Nord, États-Unis.
- Krogmann, U., L.S. Boyles, C.J. Martel et K.A. McComas (1997). Biosolids and sludge management. *Water Env. Res.*, 69: 534-550.
- Kumar, C.G. et H. Takagi (1999). Microbial alkaline proteases : from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.*, 17: 561-594.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30 : 291-310.
- Lachhab, K., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (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.
- Lake, D.L., P.W.W. Kirk et J.N. Lester (1984). Fractionation, characterization, and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge-amended soils : a review. *J. Environ. Qual.*, 13 (2) : 175-183.
- Lamontagne, E. (2004). Caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* d'intérêt pour la production de biopesticide et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, Canada, 79 pages + annexes.

- Laufenderg, G., B. Kunz et M. Nystroem (2003). Transformation of vegetable waste into value added products : (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technol.*, 87 : 167-198.
- LeBlanc, M.E. (2004). Effets des différentes stratégies et 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, 164 pages + annexes.
- Lecadet, M.-M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, S. Hamon, P. Laurent et I. Thiéry (1999). Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 86 : 660-672.
- Li, R.S., P. Jarrett et H.D. Burges (1987). Importance of spores, crystals and δ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J. Inv. Pathol.*, 50 : 277-284.
- Li, Y.-Y. et T. Noike (1992). Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pretreatment. *Water Sci. Technol.*, 26 (3-4) : 857-866.
- Lin, J.-G., Y.-S. Ma et C.-C. Huang (1998). Alkaline hydrolysis of the sludge generated from a high-strength, nitrogenous-wastewater biological-treatment process. *Bioresource Tech.*, 65 : 35-42.
- Lisansky, S.G. (1999-2000). *Biopesticides : markets, technology, registration & IPR companies, 5th edition*. CPL Scientific, Newbury, Royaume-Uni, 4 volumes, vii + 955 pages.
- Lisansky, S.G. (1996). *Biopesticides : markets, technology, registration & IPR companies, 4th edition*. CPL Scientific, Newbury, Royaume-Uni, 2 volumes, viii + 549 pages.
- Lisansky, S.G., Quinlan, R.J. et G. Tassoni (1993). *The Bacillus thuringiensis production handbook*. CPL Scientific Ltd, Newbury, Royaume-Uni, 124 pages.
- Liu, W.M., V. Bihari et R.K. Bajpai (1995). A carbon-limited medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Hindustan Antibiotic Bull.*, 37 (1-4) : 1-8.
- Liu, B.-L. et Y.-M. Tzeng (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Eng.*, 18 : 413-418.
- Liu, B.-L., Y.-M. Tzeng et C.-T. Wei (2000). Recovery of solubilized delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* fermentation broth. *Pest Manag. Sci.*, 56 : 448-454.
- Lombardi, A.T. et O. Garcia (1999). An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. *Crit. Rev. Microbiol.*, 25 (4) : 275-288.
- Lora, J.H. et G.C. Wolfgang (2002). Recent industrial applications of lignin - A sustainable alternative to nonrenewable materials. *J. Polym. Env.*, 10 (1/2) : 39-48.
- Lovgran, A., M. Zhang, A. Engstorm, G. Dalhammar et R. Landen (1990). Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.*, 4 : 2137-2146.

- Lowry, O. H., A. Rosebrough, A. Farr et R. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265.
- Lundgren, D. G. et J. J. Cooney (1962). Chemical analyses of asporogenic mutants of *Bacillus cereus*. *J. Bact.*, 83 : 1287-1293.
- Lüthy, P., J.-L. Cordier et H.-M. Fischer (1982). *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide : basic considerations and application. Dans : Kurstak, E. (éd.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, É.-U., p.35-74.
- Mahillon, J. et J. Delcour (1984). A convenient procedure for the preparation of highly purified parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. Microbiol. Methods*, 3 : 69-76.
- Masse, L., K.J. Kennedy et S. Chou (2001). Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particules in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technol.*, 77 (2) : 145-155.
- Mata-Alvarez, J., Macé, S. et P. Labrès (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technol.*, 74 : 3-16.
- Marrone, P. G. (1999). Microbial pesticides and natural products as alternatives. *Outlook on agriculture*, 28 (3) : 149-154.
- McBride, M. B. (1998). Soluble trace metals in alkaline stabilized sludge products. *J. Env. Qual.*, 27: 578-584.
- McClintock, J., C.R. Schaffer et R.D. Sjobald (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.*, 45 : 95-105.
- McMorran, A. (1965). A synthetic diet for the spruce budworm, *Choritonera fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera : Tortricidae). *Can. Entomol.*, 97 : 58-62.
- MEF (1995). *Guide de procédures : assurance et contrôle de la qualité pour les travaux analytiques contractuels en chimie*. Direction des laboratoires, Ministère de l'Environnement et de la Faune, Québec, Canada.
- MEF (1998). *Plan d'action québécois sur la gestion des matières résiduelles 1998-2008*. Ministère de l'Environnement et de la Faune et Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement, Québec, Canada, 56 pages.
- Menn, F.R. et J.J. Hall (1998). *Biopesticides : uses and delivery*. Humana Press, Totowa, É.-U., 608 pages.
- MENVIQ (1986). *Sédiments-Détermination de l'azote et du carbone total, Analyse élémentaire (CHN) 86.09/305*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada.
- MENVIQ (1989). *Méthode de digestion des boues d'épuration 89.12/213 – mét. 1.3*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada.
- MENV (2004). *Guide de valorisation des matières résiduelles fertilisantes – Critères de référence et normes réglementaires*. Direction du milieu rural, Ministère de l'Environnement du Québec, Québec, Canada, 138 pages.

- Meunier, N. (1999). *Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration*. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau, Université du Québec, Québec, Canada, 168 pages.
- Midilli, A., M. Dogru, G. Akay et C.R. Howarth (2002). Hydrogen production from sewage sludge via a fixed bed gasifier product gas. *Int. J. Hydrogen Ener.*, 27 : 1035 - 1041.
- Milne, R., D. Murphy et P.G. Fast (1977). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxine : an improved technique for the separation of crystals from spores. *J. Inv. Pathol.*, 29 : 230-231.
- Milner, R.J. (1994). History of *Bacillus thuringiensis*. *Agricul. Ecosyst. Env.*, 49 : 9-13.
- Miron, Y., G. Zeeman, J. B. Van Lier et G. Lettinga (2000). The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Res.*, 34 (5) : 1705-1713.
- Miyasono, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda et Y. Hayashi (1994). Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Inv. Pathol.*, 111-112.
- Mohammedi, S. (2004). *Isolement et caractérisation de souches de Bacillus thuringiensis dans les boues d'épuration*. Thèse de doctorat déposée, Université du Québec, INRS-Eau, Québec, Canada.
- Mohan, M. et G.T. Gujar (2001). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Crop Protection*, 20 : 311-316.
- Mohd-Salleh, M.B. et L.C. Lewis (1982). Toxic effects of spore/crystal ratios of *Bacillus thuringiensis* on European corn borer larvae. *J. Inc. Pathol.*, 39 : 290-297.
- Molla, A.H., A. Fakhru'l-Razi, S. Abd-Aziz, M.M. Hanafi, P.K. Roychoudhury et M.Z. Alam (2002). A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresource Technol.*, 85 : 263-272.
- Montgomery, R. (2004). Development of biobased products. *Bioresource Technol.*, 91 : 1-29.
- Moo-Young, M. (1985). *Comprehensive biotechnology : The principles, Applications & Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine, Volume 2 - The principles of Biotechnology : Engineering Considerations*. Pergamon Press, New York, É.-U., 632 pages.
- Mor, S.G. et G.A. Matthews (2003). Recent developments in sprayers for application of biopesticides – an overview. *Biosystems Eng.*, 84 (2) : 119-125.
- Morris, O.N., V. Converse et P. Kanagaratnam (1995). Chemical additive effects on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* against *Mamestra configurata* (Lepidoptera : Noctuidae). *Biol. Microbial Control*, 88 (4) : 815-824.
- Morris, O.N., V. Converse, P. Kanagaratnam and J.S. Davies (1996). Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 1330). *J. Inv. Pathol.*, 67 : 129-136.

- Mukerjee, S.R. et A.D. Levine (1992). Chemical solubilization of particulate organics as a pretreatment approach. *Water Sci. Technol.*, 26 (9-11) : 2289-2292.
- Müller, J.A. (2000). Pretreatment processes for the recycling and reuse of sewage sludge. *Water Sci. Technol.*, 42 (9) : 167-174.
- Mummigatti, S.G., Raghunathan, A.N. (1990). Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. inv. Pathol.*, 55 : 147-151.
- Murrell, W.G. (1961). Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. Dans : *Microbial reaction to environment, 11th symposium of the society for society for general microbiology held at the Royal Institution, London 1961*, Cambridge University Press, Londres, Royaume-Uni, p. 100-150.
- Mukherjee, S.R. et A.D. Levine (1992). Chemical solubilization of particulate organics as a pretreatment approach. *Water Sci. Technol.*, 26 (9-11) : 2289-2292.
- Mustranta, A. et L. Viikari (1993). Dewatering of activated sludge by an oxydative treatment. *Water Sci. Technol.*, 28 (1): 213-221.
- Narkis, N. et M. Schneider-Rotel (1980). Evaluation of ozone induced biodegradability of wastewater treatment plant effluent. *Wat Res.*, 14 : 929-939.
- NBPBCO (2001a). *Biobased products and bioenergy vision*. National biobased products and bioenergy coordination office, Département de l'énergie des États-Unis, National Academy Press, Washington, É.-U., 18 pages.
- NBPBCO (2001b). *Biobased products and bioenergy roadmap*. National biobased products and bioenergy coordination office, Département de l'énergie des États-Unis, National Academy Press, Washington, É.-U., 28 pages.
- Neale, M. (2000). The regulation of natural products as crop-protection agents. *Pest Manag. Sci.*, 56, 677-680.
- Neyens, E. et J. Baeyens (2003). A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *J. Haz. Mat.*, B98 : 51-57.
- Neyens, E., J. Baeyens et C. Creemers (2003a). Alkaline thermal sludge hydrolysis. *J. Haz. Mat.*, B97 : 295-314.
- Neyens, E., J. Baeyens, M. Weemaes et B. De heyder (2003b). Hot acid hydrolysis as a potential treatment of thickned sewage sludge. *J. Haz. Mat.*, B98 : 275-293.
- Neyens, E., J. Baeyens, M. Weemaes et B. De heyder (2003c). Pilot-scale peroxidation (H_2O_2) of sewage sludge. *J. Haz. Mat.*, B98 : 91-106.
- Neyens, E., J. Baeyens, R. Dewil et B. De heyder (2004). Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substabces to improve activated sludge dewatering. *J. Haz. Mat.*, 106B : 83-92.

- Nishiitsutsuji, U. et Y. Endo (1980). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : relative roles of spores and crystals in toxicity to *Pieris*, *Lymantria* and *Ephestia* larvae. *Appl. Entomol. Zool.*, 15 (4) : 416-424.
- Norris, J.R. (1971). The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : biosynthesis and physical structure. Dans : Burges, H.D et N.W. Hussey (éds), *Microbial Control of insects and mites*, Academic Press Inc., New York, É.-U., p. 229-246.
- Novelli, A., F. Ottonello, A. Converti, A. Lodi, M. Rovatti et M. Del Borghi (1995). Alkaline hydrolysis for the treatment of the organic fraction of municipal solid wastes and sludges. *Chem. Biochem. Eng.*, 9 (4) : 195-199.
- Novo Nordisk (2000). Site Internet de la compagnie (<http://www.novonordisk.com>).
- NRC (1999). *Biobased industrial products : priorities for research and commercialization*. United States National Research Council, National Academy Press, Washington, É.-U., 144 pages.
- Obrador, A., M. I. Rico, J. M. Alvarez et J. Novillo (2001). Influence of thermal treatment on sequential extraction and leaching behaviour of trace metals in a contaminated sewage sludge. *Bioresource technol.*, 76 : 259-264.
- Odegaard, H., B. Paulsrud et I. Karlsson (2002). Wastewater sludge as a resource : sludge disposal strategies and corresponding treatment technologies aimed at sustainable handling of wastewater sludge. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 295-303.
- OIT (1999a). *Plant/crop-based renewable resources 2020: a vision to enhance US economic security through renewable plant/crop-based resource use*. Office of industrial technologies, Département de l'énergie des Etats-Unis, National Academy Press, Washington, 28 pages.
- OIT (1999b). *Technology roadmap for plant/crop-based renewable resources 2020: research priorities for fulfilling a vision to enhance US economic security through renewable plant/crop-based resource use*. Office of industrial technologies, Département de l'énergie des Etats-Unis, National Academy Press, Washington, 44 pages.
- Olivier, B. G. et J. H. Carey (1976). Acid solubilization of sewage sludge and ash constituents for possible recovery. *Water Res.*, 10 : 1077-1081.
- Oppert, B. (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.*, 42 : 1-12.
- Ozkan, M., F.B. Dilek, U. Yetis et G. Ozcengiz (2003). Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Res. Microbiol.*, 154 : 49-53.
- Pandey, A. et C.R. Soccol (2000). Economic utilization of crop residues for value addition : a futuristic approach. *J. Sci. Ind. Res.*, 59 : 12-22.
- Pavlosthatiss, S.G. et J.M. Gosset (1985). Alkaline treatment of wheat straw for increasing anaerobic biodegradability. *Biotechnol. Bioeng.*, 27 : 334-344.
- Pearson, D. et O.D. Ward (1988). Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.*, 10 (7) : 451-456.

- Pelmont, J. (1993a). *Bactéries et Environnement : Adaptations Physiologiques*. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, 899 pages.
- Pelmont, J. (1993b). *Enzymes*. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, 605 pages.
- Pelzcar, M.J., E.C.S. Chan et N.R. Krieg (1993). *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill Inc., New York, É.-U., 896 pages.
- Penaud, V., J.P. Delgènes et R. Moletta (1999). Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass : influence of sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enz. Microbial Technol.*, 25 : 258-263.
- Perani, M., A.H. Bishop et A. Vaid (1998). Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 160 : 55-60.
- Perlack, R.D. et A.F. Turhollow (2003). Feedstock cost analysis of corn stover residues for further processing. *Energy*, 28 : 1395-1403.
- Piggot, P.J. et J.G. Coote (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.*, 40 (4) : 908-962.
- Piggot, J.P., J.E. Bylund et M.L. Higgins (1994). Morphogenesis and gene expression during sporulation. Dans : Piggot, J.P. et M. Youngman (éds), *Regulation of bacterial differentiation*, American Society for Microbiology, Washington, É.-U., p. 113-137.
- Porcar, M. et V. Juarez-Pérez (2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26 : 419-432.
- Powell, J.F. et J.R. Hunter (1955). The sporulation of *Bacillus sphaericus* stimulated by association with other bacteria : an effect of carbon dioxide. *J. gen. Microbiol.*, 13 : 54-58.
- Powell, J.F. et R.E. Strange (1956). Biochemical changes occurring during sporulation in *Bacillus* species. *Biochem. J.*, 63 (4) : 661-668.
- Peyronnet, O., B. Nieman, F. Généreux, V. Vachon, R. Laprade et J.-L. Schwartz (2002). Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C δ -endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1567 : 113-122.
- Rajan, R.V., Lin, J.-G. et B.T. Ray (1989). Low-level chemical pretreatment to enhanced sludge solubilization. *Res. J. WPCF*, 61 (11-12): 1678-1683.
- Rajalakshi, S. et Y. L. Sethna (1977). The effects of amino acids on growth, sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Ind. Inst. Sci.*, 59 : 169-176.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge et V.V. Deshpande (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3) : 597-635.
- Ray, B.T., J.-G. Lin et R.V. Rajan (1989). Low-level alkaline solubilization for enhanced anaerobic digestion. *Res. J. WPCF*, 62 (1) : 81-87.

- Reddy, S.T. et G. Venkateswerlu (1997). Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*: detection and analysis by gelatin zymography. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 43 (5) : 935-943.
- Rivera, D. (1999). *Growth kinetics of Bacillus thuringiensis batch, fed-batch and continuous bioreactor cultures*. Thèse de doctorat, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, 210 pages.
- Rocher, M., G. Goma, A.P. Begue, L. Louvel et J.L. Rols (1999). Towards a reduction in excess sludge production in activated sludge processes : biomass physicochemical treatment and biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 : 883-890.
- Rogers, H.R. (1996). Sources, behavior and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Tot. Env.*, 185 : 3-26.
- Rojas, L.I., R. Cruz-Camarillo, M.I. Guerrero, R. Rodriguez-Vasquez et J.E. Ibarra (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15 : 261-268.
- Rowe, G.E. et A. Margaritis (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 6 (1) : 87-127.
- Rowe, G.E. et A. Margaritis (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 *kurstaki*. *Biotechnol. Bioeng.*, 86 (4) : 377-388.
- Rukimini, V., C.Y. Reddy et G. Venkateswerlu (2000). *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin : role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*, 82 : 109-116.
- Sachdeva, V., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (1999a). Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Res. Devel. Microbiol.*, 3 ; 363-375.
- Sachdeva, V., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (1999b). Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Sci. Technol.*, 42 : 211-216.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler et D.H. Dean (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3) : 775-806.
- Saksinchai, S., M. Suphantharika et C. Verduyn (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* : a physiological study. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 : 307-316.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H. T. Dulmage et A. El-Sharaby (1983). Novel fermentation media for production of (-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Inv. Pathol.*, 41 : 8-19.
- Sampson, M.N. et G.W. Gooday (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, 144 : 2189-2194.
- Sanchez, S. et A.L. Demain (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enz. Microbial Technol.*, 31 : 895-906.

- Scherrer, L., P. Luthy et B. Trumpi (1973). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Microbiol.*, 25 (4) : 644-646.
- Schieder, D., R. Schneider et F. Bischof (2000). Thermal hydrolysis (TDH) as a pretreatment method for the digestion of organic waste. *Water Sci. Technol.*, 41 (3) : 181-187.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler et D.H. Dean (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3) : 775-806.
- Seigel, J.P. (2001). Mini-review: The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticide. *J. Inv. Pathol.*, 77: 13-21.
- Shahabuddin, M. et D.C. Kaslow (1993). Chitinase : a novel target for blocking parasite transmission? *Parasitol Today*, 9: 252-255.
- Shanableh, A. et S. Jomaa (2001). Production and transformation of volatile fatty acids from sludge subjected to hydrothermal treatment. *Water Sci. Technol.*, 44 (10): 129-135.
- Sharpe, E.S., K.W. Nickerson, L.A. Bulla et J.A. Aronson (1975). Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. *Appl. Microbiol.*, 30 (6) : 1052-1053.
- Shih, L.L., Y.T. Yan et Y.N. Chang (2002). Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(-glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enz. Microbiol. Technol.*, 31 : 213-220.
- Shimada, N., Y.S. Kim, K. Miyamoto, M. Yoshioka, H. Murata (2003). Effect of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 65 (2) : 187-191.
- Sikdar, D.P., M.K. Majumdar et S.K. Majumdar (1991). Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnol. Lett.*, 13 (7) : 511-514.
- Singh, T. et J.W. Patterson (1974). Improvement of the aerobic sludge digestion process efficiency. *J. WPCF*, 46 (1) : 102-112.
- Slatter, P.T. (1997). The rheological characterisation of sludges. *Water Sci. Technol.*, 36 (11) : 9-18.
- Slepecky, R.A. et H.E. Hemphill (1992). The genus *Bacillus*-nonmedical. Dans : Balows, H. G., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds), *The Prokaryotes*, 2^{iem} edition, Springer-Verlag, New York, É.-U., p. 1663-1696.
- Smirnoff, W.A. (1980). Deposit assessment of Bt formulation applied from an aircraft. *Can. J. Microbiol.*, 26 : 1364-1366.
- Smirnoff, W.A. et J.R. Valéro (1983). Characteristic of a highly concentrated *Bacillus thuringiensis* formulation against spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae). *Can. Entomol.*, 115 : 443-444.

- Smith, G. et J. Göransson (1992). Generation of an effective internal carbon source for denitrification through thermal hydrolysis of pre-precipitated sludge. *Water Sci. Technol.*, 25 (4-5) : 211-218.
- Sneath, P.H.A. (1984). Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. Dans : Bergey, D. H., J. G. Holt et N. R. Krieg (éds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2*, Williams & Wilkins, New York, É.-U., chapitre 13.
- Solomons, T.W.G. (1997). *Fundamentals of organic chemistry, fifth edition*. John Wiley & Sons Inc., New-York, É.-U., 1068 pages.
- Somerville, H.J., Y. Tanada et E.M. Omi (1970). Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of *Bacillus thuringiensis* on several lepidopterous insects. *J. Inv. Pathol.*, 16 : 241-248.
- SOPFIM (2004). Site Internet de la Société de protection des forêts contre les insectes et les maladies (<http://www.sopfim.qc.ca>).
- Starzak, M. et R.K. Bajpai (1991). A structured model for vegetative growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29 : 699-718.
- StatSoft (2004). *Electronic Statistics Textbook*. StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, É.-U., (<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>).
- Stuckey, D.C. et P.L. McCarty (1979). Thermochemical pre-treatment of nitrogenous materials to increase methane yield. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 8 : 219-233.
- Tirado-Montiel, M.T.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, 223 pages.
- Tirado-Montiel, M.T.L., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (1998). Production of *Bacillus thuringiensis* using waste materials. Dans : Martin, A. M. (éd.), *Bioconversion of waste materials to industrial products*, Blackie Academic Press & Professionnal, Londres, Royaume-Uni, p. 480-516.
- Tanaka, S., T. Kobayashi, K. Kamiyama et N.S. Biladan (1997). Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Water Sci. Technol.*, 35 (8) : 209-215.
- Tanaka, S. et K. Kamiyama (2002). Thermochemical pretreatment in the anerobic digestion of waste activated sludge. *Water Sci. Technol.*, 46 (10) : 173-179.
- Tan, Y. et W.P. Donovan (2000). Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis* : effect on insecticidal crystal proteins. *J. Biotechnol.*, 84 : 67-72.
- Thiéry, I., S. Hamon, A. Délécluse et S. Orduz (1998). The introduction into *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin *cyt1Ab1* gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (10) : 3910-1916.

- Thomas, W.E. et D.J. Ellar (1983). *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin : effets on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.*, 60 : 181-197.
- Turovskiy, I. S. (2000). Biosolids or sludge? The semantics of terminology. *Wat. Eng. Man.*, April: 19-21.
- Tyagi, R.D., V. Sikati Foko, S. Barnabé, A.S. Vidyarthi et J.R. Valéro (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material. *Water Sci. Technol.*, 46 (10): 247-254.
- Valéro, J.R., S. Mohammedi, N.J. Payne et R.D. Tyagi (1999). Microbial control of defoliating insects. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, 3 : 455-464.
- Van Collie, R., A. Lajoie, C. Roberge et J.K. Atchade (2004). Évaluation écotoxicologique de l'effluent de la Station Est de la Ville de Québec – Partie 1 : Évaluation du danger environnementale. *Vecteur Environnement*, 37 (1) : 41-52.
- Van Wyk, J.P.H. (2001). Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnol.*, 19 (5) : 172-177.
- Van Wyk, J.P.H. (2002). Biodevelopment of wastepaper as a resource of renewable energy : influence of enzyme concentration and paper amount on the bioconversion process. *Energy & fuels*, 16 : 1277-1279.
- Vidyarthi, A.S., M. Desrosiers, R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2000). Foam control in biopesticide production from sewage sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 86-92.
- Vidyarthi, A.S., R.D. Tyagi, J.R. Valéro et R.Y. Surampalli (2002). Studies on the production of *B. thuringiensis* using wastewater sludge as a raw material. *Wat. Res.*, 36 : 4850-4860.
- Vlyssides, A.G. et P.K. Karlis (2004). Thermal-alkaline solubilization of waste activated sludge as a pre-treatment stage of anaerobic digestion. *Bioresource Technol.*, 91 : 201-206.
- Vora, D. et Y.I. Shetna (1999). Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in oil seed meal extract media containing cystine. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15 : 747-749.
- USEPA (1999). *Biosolids generation, use and disposal in United States*. Municipal and Industrial Solid Waste Division, Office of Solid Waste, United States Environmental Protection Agency, Washington, É.-U., 81 pages.
- Weemaes, M., H. Grootaerd, F. Simoens, A. Huysmans et W. Verstraete (2000). Ozonation of sewage sludge prior to anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.*, 42 (9) : 175-178.
- Whitehead, N.A., A.M.L. Barnard, H. Slater, N.J.L. Simpson, G.P.C. Salmond (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25 : 365-404
- Whiteley, H.R. et H.E. Schnepf (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40 : 549-576.

- Wiwat, C., S. Thaithanun, S. Pantuwatana et A. Bhumiratana (2000). Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J. Inv. Pathol.*, 76 : 270-277.
- Woodard, S.E. et R.F. Wukach (1994). A hydrolysis/thickening/filtration process for treatment of waste activated sludge. *Water Sci. Technol.*, 30 (3) : 29-34.
- Wozniak, D.J. et J.Y.C. Huang (1982). Variables affecting metals removal from sludge. *J. WPCF*, 54 (12) : 1574-1580.
- Xiong, G., C. Jinquan, H. Zhipeng, T. Yubo et G. Rixia (1998). Batch fermentation and optimization of media for *Bacillus thuringiensis*. *Chinese J. Biotechnol.*, 14 (1) : 45-51.
- Yang, X.-M. et S.S. Wang (1998). Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28: 95-98.
- Yaylayan, A.V. et A. Huyghues-Despointes (1994). Chemistry of Amadori Rearrangement products : analysis, synthesis, kinetics, reactions and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 34 (4): 321-369.
- Yeza, A. (2004). Conception d'une stratégie opérationnelle de production de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* en utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Thèse de doctorat en voie de rédaction, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, Canada.
- Yousten, A.A. et M.H. Rogoff (1969). Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. *J. Bacteriol.*, 100 : 1229- 1236.
- Yu, C.-G., Mullins, M.A., Warren, G.-W., Koziel, M.G. et J.J. Estruch (1997). The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 532-536.
- Zeigler, D.R. (1999). *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition, Part 2: Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus*. The *Bacillus* Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, Ohio, États-Unis, 56 p.
- Zouari, N. et S. Jaoua (1999a). Production and characterization of metalloproteases synthesised concomitantly with (-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enz. Microbial Technol.*, 25 : 364-371.
- Zouari, N. et S. Jaoua (1999b). The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23 : 497-502
- Zorpas, A.A., Vlyssides, A.G., Zorpas, G.A., Karlis, P.K. et D. Arapoglou (2001). Impact of thermal treatment on metal in sewage sludge from the Psittalias wastewater treatment plant, Athens, Greece. *J. Hazard. Mat.*, B82 : 291-298.



ANNEXE 1
Barnabé et al., 2003 et 2004



L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article.

Barnabé, S., Sasseville, J.L., Tyagi, R.D. et Valéro, J.R. (2003). Eaux usées et les résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières? / Industrial wastewaters and biosolids, tertiary products or raw materials? *Vecteur Environ.* 36(2): 50-62.



L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article.

Barnabé, S., Sasseville, J. L., Valéro, J. R. et Tyagi, R. D.(2004) Eaux usées, boues d'épuration et autres résiduelles, de matières tertiaires à matières premières : comment intégrer la bio-industrie émergente et connaître le succès? Dans : 5^e Salon des technologies environnementales du Québec.



ANNEXE 2
Information complémentaire
sur les endospores

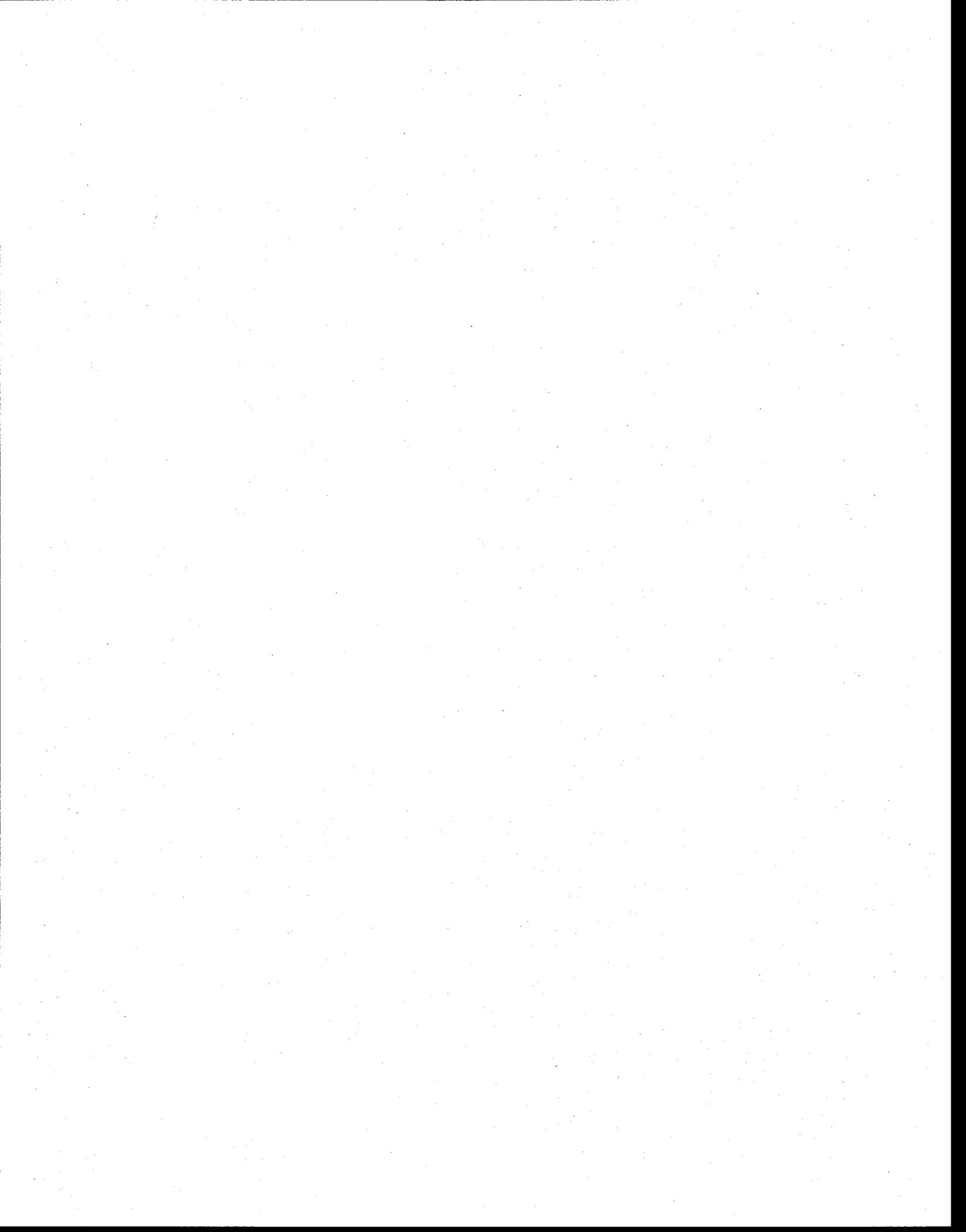
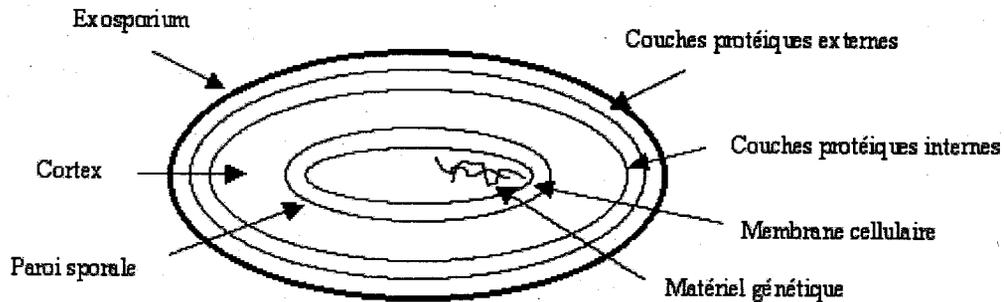


Illustration d'une endospore. Les enzymes, l'ARN, l'ADN, des inclusions membranaires et des mésosomes se trouvent au centre et sont entourés d'une membrane cellulaire. Une paroi sporale enveloppe le centre de la spore suivie du cortex qui contient la majorité du DAP. Plusieurs couches protéiques (internes et externes) recouvrent le protoplaste et confèrent la résistance à la spore. Ces couches occupent 50% du volume de la spore et peuvent contenir des protéines similaires aux delta-endotoxines de Bt. Les couches sont recouvertes par une mince membrane protéique appelée l'exosporium (Gould, 1969 ; Murrell, 1969 ; Lundgren et Cooney, 1962).



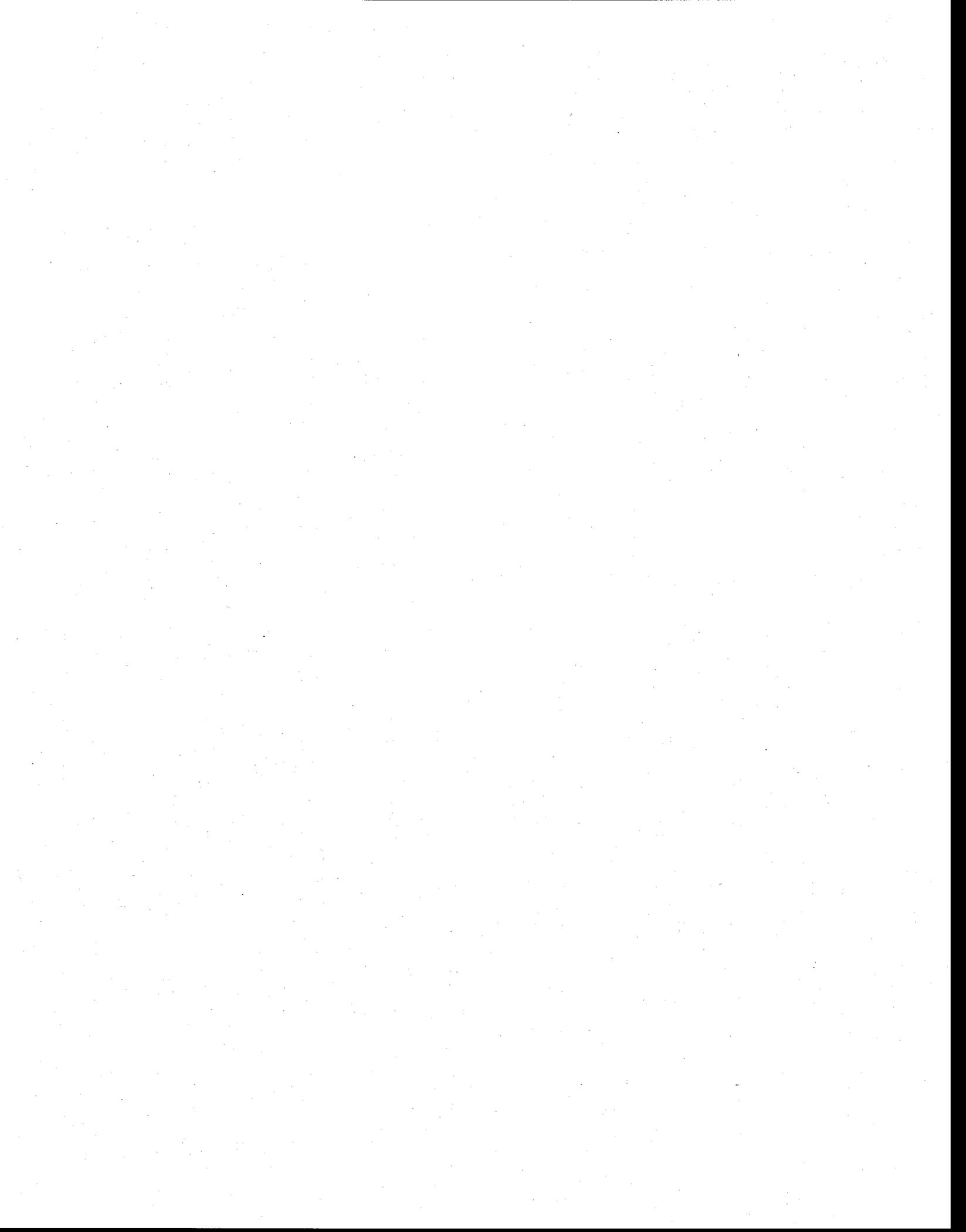
Processus de transformation de la spore en cellule végétative (Murrell, 1961 ; Foster et Johnstone, 1969 ; Gould, 1969 ; Sneath, 1984).

Étapes de la transformation	Description
Activation	Réveil l'endospore de sa dormance qui est aussitôt prête à germiner. L'activation est induite par des « germinants » comme certains acides aminés, des ribosides et des sucres ainsi que la température, le pH, l'activité de l'eau (A_w) et la force ionique du milieu. Le germinant nutritif le plus commun est la L-alanine en présence des ions Na^+ et K^+ .
Germination	Transformation de la spore dormante activée en un état sensible métaboliquement actif (endospore germée).
Surcroissance	Développement d'une cellule végétative à partir d'une endospore germée.



ANNEXE 3

Consultation de travaux sur la relation entre les spores de Bt et l'entomotoxicité



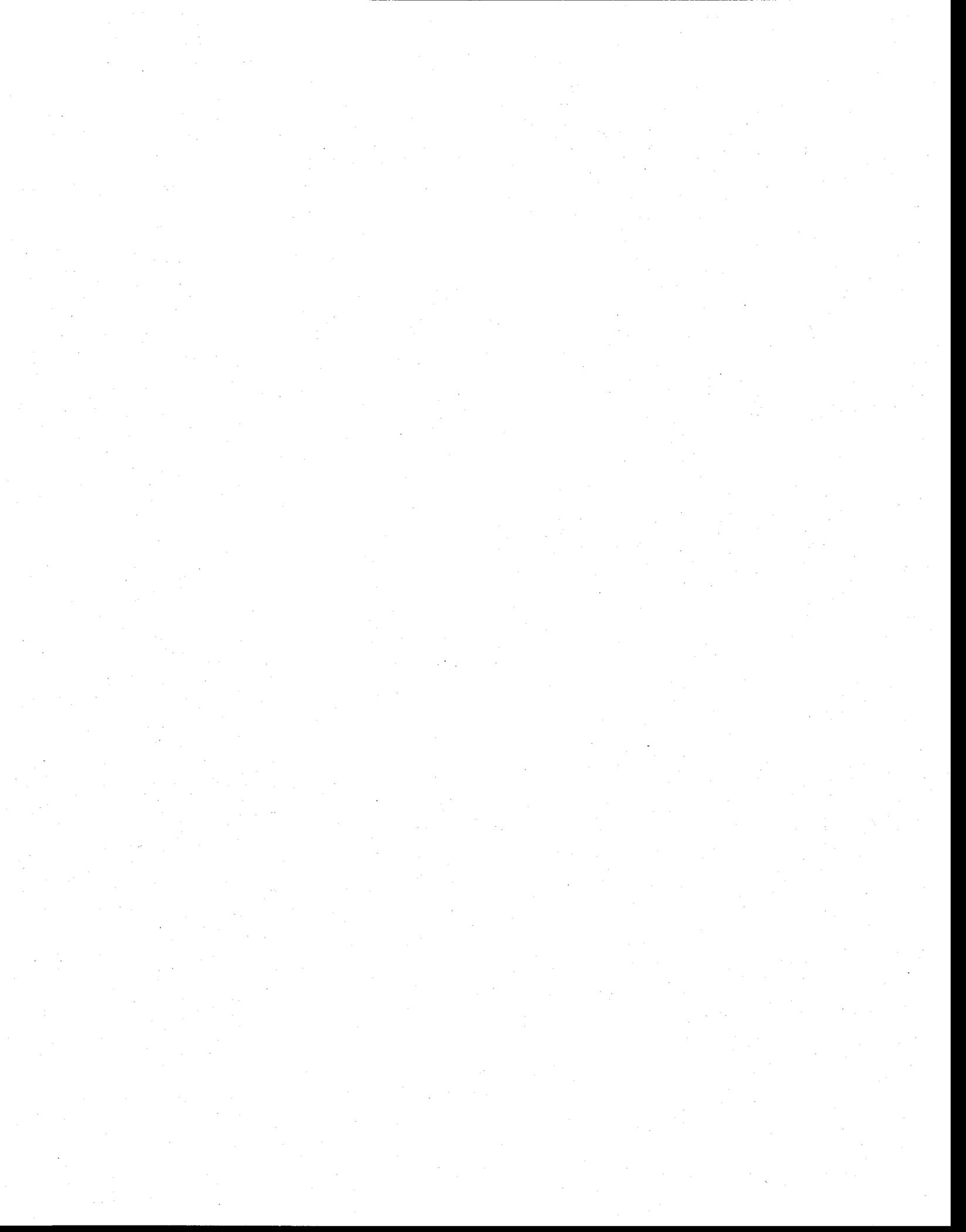
Quelques travaux discutant de la relation entre les spores de Bt et l'entomotoxicité.

Auteurs	Points saillants des travaux
Dulmage et al. (1970)	Les auteurs n'ont observé aucune relation entre les spores et l'activité insecticide. Pour cette raison, ils ont affirmé que les préparations de Bt ne pouvaient pas être standardisées par leur contenu en spores.
Somerville et al. (1970)	Les auteurs ont testé des suspensions de spores et des CPI purifiés de Bt sur des larves de la Coliade de la luzerne (<i>Colias eurytheme</i>), de la fausse-arpenteuse du chou (<i>Trichoplusia ni</i>) et de la légionnaire uniponctué (<i>Pseudaletia unipuncta</i>). Ils affirment que les spores peuvent être toxiques et provoquer la septicémie grâce à la présence de substances létales sur leur surface. De plus, ils mentionnent que les spores jouent un rôle important pour tuer la larve lorsqu'elles sont mélangées aux CPI. Cependant, l'entomotoxicité des spores dépend de l'espèce d'insecte. Les insectes de type I meurent des effets toxiques des CPI (paralysie générale de l'intestin) et les spores ne sont pas requises pour causer la mort. Les insectes de type II meurent aussi des effets toxiques des CPI, mais plutôt par une infection systématique que par une paralysie générale. Les spores de Bt et autres microorganismes de la flore intestinale participent à cette infection. Les insectes de type III requièrent la présence de spores pour mourir plus rapidement des effets toxiques des CPI.
Burges et al. (1976)	Les auteurs ont testé des spores et des CPI purifiés de deux sérotypes de Bt (identifiés I et V) sur des larves de la fausse-teigne des ruches (<i>Galleria mellonella</i>). Ils ont remarqué que la combinaison (1:1) de spores et de CPI du sérotype V était 10 fois plus toxique que les spores seules, et 1000 fois plus toxiques que les CPI purifiés. Ils ont aussi observé que l'entomotoxicité de la spore dépendait du sérotype de Bt car celles du sérotype I étaient faiblement actives envers l'hôte.
Mohd-Salleh et Lewis (1982)	Les auteurs ont testé des spores et des CPI purifiés de 4 sous-espèces de Bt (<i>kenyae</i> , <i>tolworthi</i> , <i>galleria</i> et <i>kurstaki</i>) sur des larves de la pyrale du maïs (<i>Ostrinia nubilalis</i>). Les spores n'étaient pas toxiques avec les larves néophytes et de 6 ^{ème} âge, mais les CPI l'étaient. La combinaison des spores et des CPI était nécessaire pour atteindre le maximum d'entomotoxicité.
Li et al. (1987)	Ces auteurs ont montré que la présence de spores augmente l'activité de la toxine chez quelques larves de lépidoptères. Ils ont examiné des préparations de cristaux ne contenant aucune spore et ils ont démontré que la fausse-teigne des ruches (<i>Galleria mellonella</i>) est une espèce dont les cristaux requièrent la présence de spores pour être toxiques. Ils ont montré aussi que le nombre de spores de Bt augmentent lorsqu'elles sont incubées dans le fluide intestinal des larves.
Misayano et al. (1994)	Les auteurs ont montré qu'en présence des spores purifiées de Btk HD-1, le taux de mortalité des larves de la fausse-teigne des crucifères causé par les CPI est 146 fois supérieure.
Dubois et Dean (1995)	Ces auteurs ont montré que les cellules bactériennes et les spores agissent en synergie avec les produits du gène <i>cryIA</i> contenus dans les spores d'une souche de Bt ne produisant pas de cristal (HD-73 <i>cry</i>). Toutefois, en absence des protéines CryIA, les cellules bactériennes et les spores ne sont pas toxiques et n'empêche pas la croissance de la larve ou du papillon. Dubois et Dean ont alors suggéré que la présence des spores, ou leur germination subséquente causée par la réduction du pH alcalin intestinal lors de la dissociation des toxines, tue plus rapidement les larves. Cette baisse de pH a cependant été contestée par Ellar (1997) ¹ .
Farrera et al. (1998)	Ils ont vérifié l'interaction entre le rapport C/N et la concentration initiale en solides totaux qui affecte la production des cristaux protéiques, de spores et de protéines Cry produites par unité de spores obtenues. Ils ont alors observé que les meilleures conditions pour la production de spores sont différentes de celles de la production des protéines Cry. Ils ont donc conclu que de hautes concentrations en spores ne donnent pas nécessairement de fortes entomotoxicités.
Asano et al. (2000)	Les auteurs ont testé la synergie des spores de 2 sous-espèces de Bt (<i>kurstaki</i> et <i>japonensis</i>) sur les larves de la fausse-teigne des crucifères (<i>P. xylostella</i>). La combinaison des spores de Bt var. <i>japonensis</i> avec les CPI de Btk a augmenté l'entomotoxicité de 120 fois après 2 jours. Cependant, après 7 jours, il n'y avait plus d'effet synergique. Il n'y avait pas d'effet en combinant des spores tuées avec des CPI. Les auteurs ont conclu que les spores viables diminuent le temps des CPI pour tuer la larve.
Donavan et al. (2001)	Les auteurs énumèrent plusieurs études où des spores purifiées de Bt ont été ajoutées à des suspensions de CPI purifiées, ce qui pouvait augmenter l'entomotoxicité de 10 fois envers les larves de la fausse-teigne des crucifères (<i>Plutella xylostella</i>) et de la noctuelle de la betterave (<i>Spodoptera exigua</i>), de 35 fois envers les larves de la pyrale indienne de la farine et de 1000 fois envers la fausse-teigne de la cire (<i>Galleria mellonella</i>).
Ariff et al. (2001)	Leur publication ne concerne pas Bt, mais plutôt <i>B. sphaericus</i> qui est un bacille très utilisé en biocontrôle. Ses spores sont très entomotoxiques et elle ne produit pas de CPI. Ces auteurs ont démontré la capacité de <i>B. sphaericus</i> à traiter un effluent piscicole et à produire une forte quantité de spores pouvant être récoltée pour le contrôle biologique des moustiques. Un point intéressant de leurs travaux est la comparaison entre la production de Bt et <i>B. sphaericus</i> . De plus, ils discutent de l'influence du substrat et des conditions du milieu sur la toxicité des spores de <i>B. sphaericus</i> et répertorient d'autres études intéressantes dont : (i) Dharmstithi et al. (1985) ² qui ont démontré une meilleure croissance et toxicité de <i>B. sphaericus</i> en utilisant un sous-produit d'usine de fabrication du glutamate de monosodium ; (ii) et Karim et al. (1993) ³ qui ont obtenu des spores moins toxiques lors de la croissance bactérienne à des niveaux d'oxygène dissous saturés (100%) que celles obtenues à des niveaux inférieurs à 50%. Ces deux études indiquent qu'il y a un lien entre les niveaux d'oxygène dissous et la toxicité des spores de <i>B. sphaericus</i> et qu'il y a un lien entre les niveaux d'oxygène dissous et les degrés de sporulation. Cependant, la toxicité de <i>B. sphaericus</i> et ses degrés de sporulation ne sont pas nécessairement reliés. Ariff et al. (2001) ont donc conclu que l'efficacité de leur système dépendait du degré de sporulation et de la toxicité de <i>B. sphaericus</i> , tous deux reliés aux niveaux d'oxygène dissous. À titre d'information, l'agent entomotoxique dans les formulations de <i>B. sphaericus</i> est principalement la spore. Une formulation de BS est plus entomotoxique si elle contient plus de spores et si les spores sont plus toxiques. Dans les travaux de Ariff et al. (2001), il y a moins de spores produites dans l'effluent piscicole (très concentré en azote) que dans un effluent piscicole contenant un supplément d'extrait de levure et pourtant, la toxicité est plus élevée. Cela signifie que les spores obtenues dans l'effluent piscicole ne contenant pas l'extrait de levure (donc moins d'azote consommé) sont plus toxiques envers les moustiques.

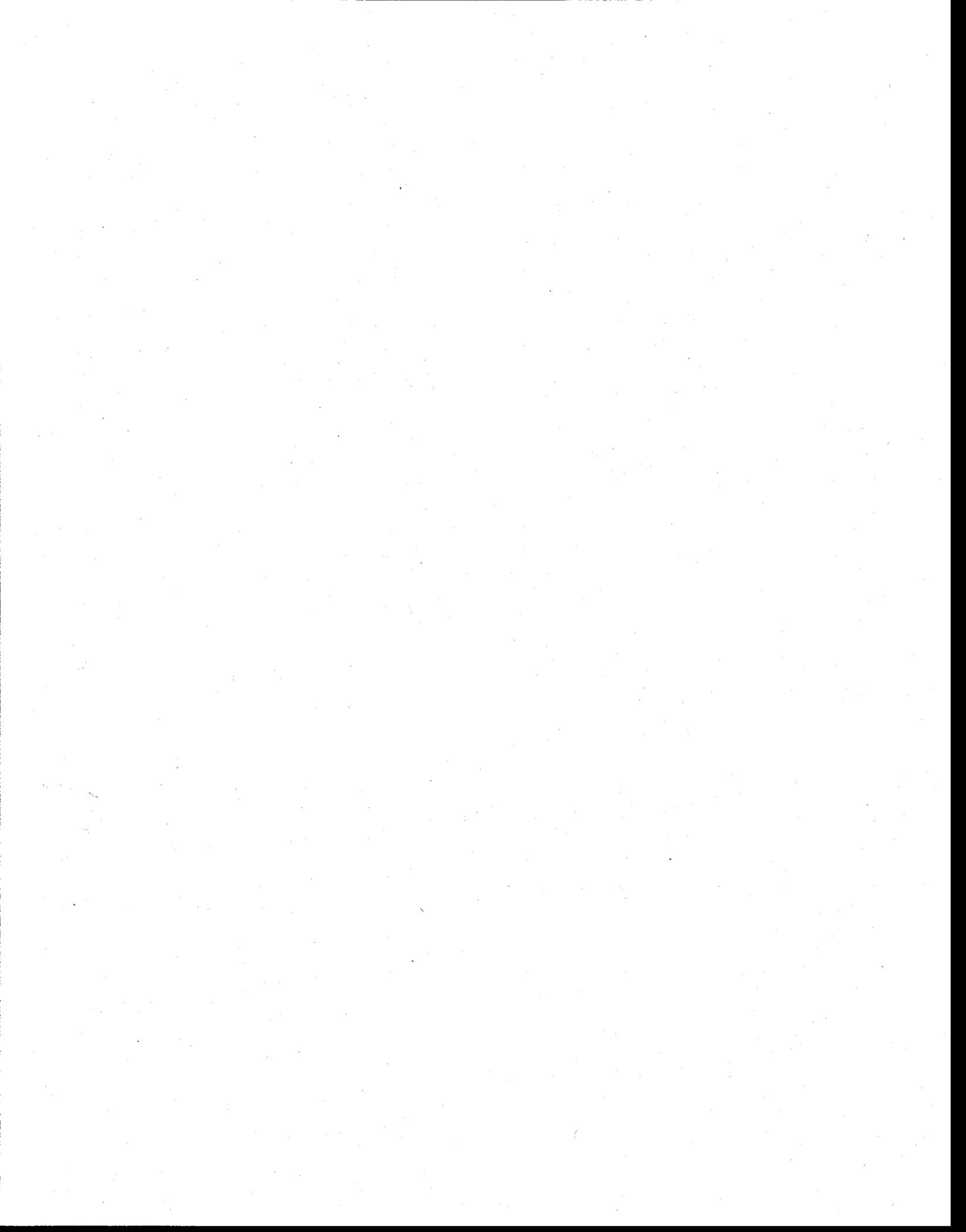
¹ Ellar, D.J. (1997). The structure and function of *B. thuringiensis* δ -endotoxins and prospects for biopesticide improvement. Dans : Evans, H.F. (éd.), 1997 BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or necessity ?, British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, p. 83-100.

² Dharmstithi, S.C., S. Pantuwatana et A. Bhumiratana. (1985) Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using by product from a monosodium glutamate factory. *J. Invertebr. Pathol.* 46 : 231-238.

³ Karim, M.I.A., R.J. Lucas, K.J. Osborne et P.L. Rogers (1993). The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362. *Biotechnol. Lett.* 15 (1) : 47-50.



ANNEXE 4
Information complémentaire sur les
protéases



Catégories de protéases (Rao et al., 1998).

Catégorie	Caractéristiques
Endopeptidases	Elles scindent les liens peptidiques des protéines et transforment les grandes chaînes de polypeptides en plus petits fragments. Elles sont divisées en 4 groupes, soit les protéases acides, les métalloprotéases, les protéases alcalines et les protéases cystéiques.
Exopeptidases	Elles attaquent les liens peptidiques près d'un groupe carboxyle libre -COOH ou près d'un groupe aminé libre -NH ₂ . Selon leur site d'action, elles sont soit des aminopeptidases (agissent sur le N terminal des polypeptides) ou des carboxypeptidases (agissent sur le C terminal). Elles libèrent des acides aminés, des dipeptides ou des tripeptides.

Groupes de protéases (Rao et al., 1998; Ellaiah et al., 2002).

Groupe	Caractéristiques
Protéases acides	Les protéases acides (ou protéases aspartiques) sont produites par les moisissures <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Endothia parasitica</i> , <i>Mucor pusillus</i> et <i>M. miehel</i> , ces endopeptidases fonctionnent à des pH acides entre 3 et 5 et ressemblent beaucoup aux enzymes digestives animales, soit la pepsine et la rénine.
Métalloprotéases	Les métalloprotéases sont des endopeptidases qui contiennent un métal essentiel pour leur conformation, généralement le zinc, et sont aussi appelées les protéases neutres car leur pH optimum se situe autour de 7. Les métalloprotéases utilisées couramment en industrie sont produites par <i>B. amyloliquefaciens</i> et <i>B. thermoproteolyticus</i> (thermolysine).
Protéases sérines ou alcalines	Les protéases alcalines sérines sont les plus importantes au niveau industriel. Ce sont des endopeptidases caractérisées par la présence d'un groupe sérine au niveau de leur site actif. Elles ont un pH optimal près de 10. Plusieurs espèces d' <i>Arthobacter</i> , de <i>Streptomyces</i> et de <i>Flavobacterium</i> en produisent, mais ce sont les espèces <i>B. amyloliquefaciens</i> et <i>B. licheniformis</i> qui produisent la protéase alcaline la plus commercialisée, soit la subtilisine. L'espèce <i>B. alcalilophilus</i> produit aussi plusieurs protéases alcalines actives à pH 12.
Protéases cystéiques	Les protéases cystéiques/thiol sont peu étudiées et n'ont pas encore d'intérêt dans les secteurs industriels ou environnementaux.

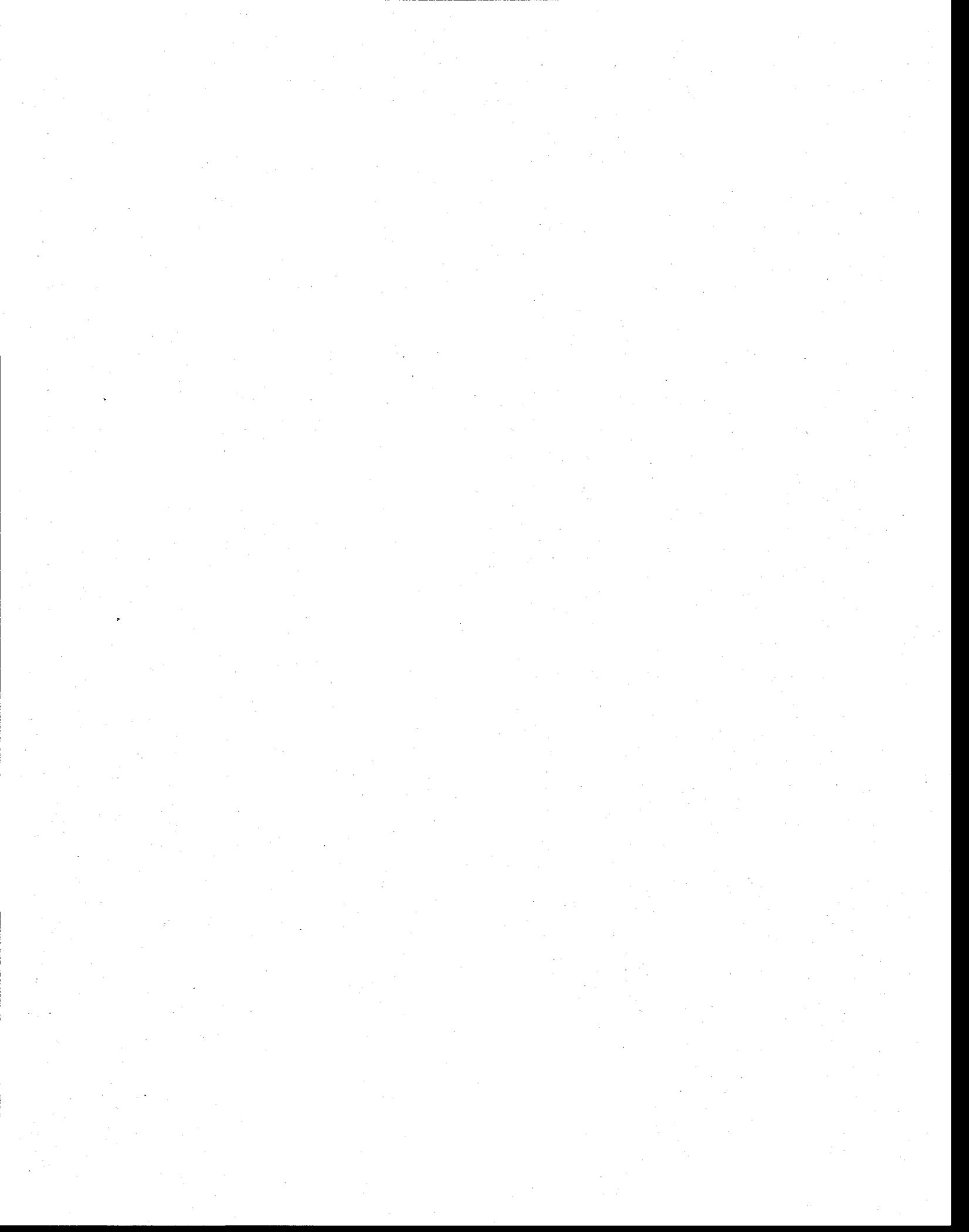


ANNEXE 5
Catégories de traitements des boues
d'épuration

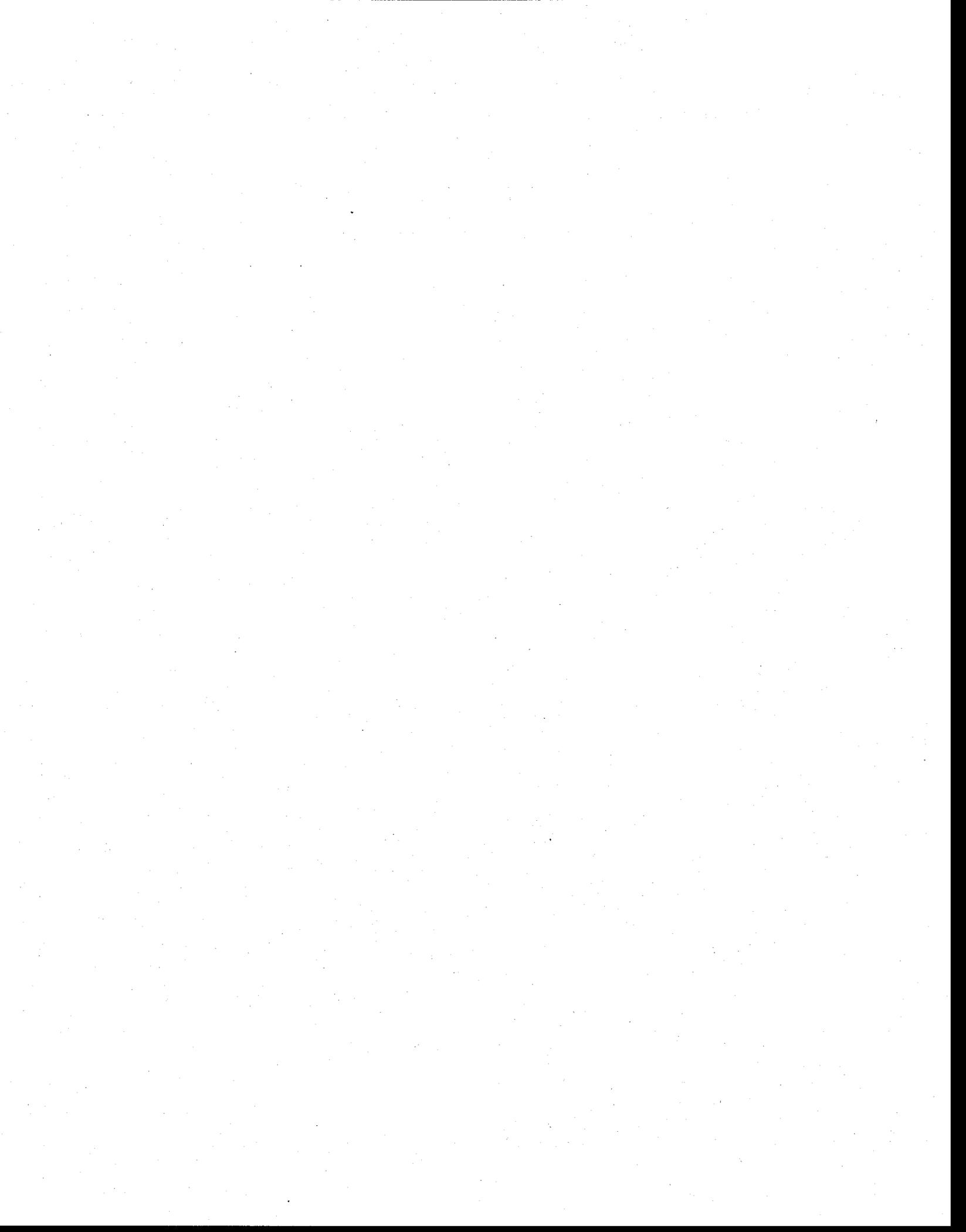


Description des catégories de traitements des boues d'épuration. Le lecteur est invité à consulter la revue de littérature de Neyens et Baeyens (2003) pour en savoir davantage sur les traitements.

Traitement	Caractéristiques
Chimique	Les traitements chimiques utilisent des agents alcalins, acides ou oxydants et transforment les composés déjà dégradables en des composés plus faciles à dégrader.
Thermique	Les traitements thermiques sont réalisées entre 40 et 180°C. Les hydrates de carbone et les lipides dans les boues d'épuration sont pour la plupart facilement dégradables alors que les protéines sont protégées de l'hydrolyse enzymatique par les membranes cellulaires des microorganismes constituant en grande partie les boues d'épuration. Les traitements thermiques brisent les cellules et rendent les protéines plus accessibles à la biodégradation. L'énergie thermique provient soit de la vapeur ou d'échangeurs de chaleur.
Mécanique	Les traitements mécaniques utilisant les ultra-sons, broyeurs, homogénéiseurs et autres nécessitent de l'énergie rotatoire, translative ou de pression pour causer des tensions et des déformations chez les solides. Les cellules microbiennes résistent à ce stress aussi longtemps que la tension est plus faible que la force des membranes cellulaires. La déformation des solides ou le bris des cellules libèrent de l'eau et des éléments nutritifs. Seuls les ultrasons peuvent transformer les éléments en des formes plus facilement assimilables par les microorganismes.
Biologique	Les traitements biologiques causent la lyse des cellules. Il peut s'agir de procédés autolytiques à des températures ambiantes ou de procédés impliquant l'ajout d'enzymes. Les traitements enzymatiques sont spécialement utilisés sur les boues ou biomasses dont le contenu en matières lignocellulosiques est élevée, ce qui n'est pas le cas avec les boues d'épuration.
Combinaison	Il existe des combinaisons comme des traitements thermiques à pH alcalin ou acide, des traitements aux ultra-sons et à pH alcalin, etc.. Généralement, ils solubilisent et améliorent davantage la biodégradabilité des éléments organiques.



ANNEXE 6
Information complémentaire sur le
matériel et les méthodes



Données brutes sur la composition des boues d'épuration mixtes et secondaires de la Station Est de la Ville de Québec utilisées dans ce travail et autres informations. nd = non déterminé.

Caractéristiques ¹	Boues mixtes						Boues secondaires							
	BEM1	BEM2	BEM3	BEM4	BEM5	BEM6	BES1	BES2	BES3	BES4	BES5	BES6	BES7	BES8 ⁴
ST (g/l)	48,4	33,1	35,1	32,3	30,1	28,0	30,7	51,1	7,1	31,6	31,7	37,0	33,5	20,4
SVT (g/l)	14,6	nd	28,4	24,9	nd	20,1	27,0	nd	5,6	23,4	27,8	nd	25,2	15,0
MES (g/l)	47,5	31,3	32,2	28,4	28,0	25,4	24,1	45,8	5,1	30,8	23,9	32,1	26,5	17,5
MVES (g/l)	13,5	nd	23,2	21,3	nd	17,2	18,1	nd	4,0	22,0	17,8	nd	19,2	13,5
C _i (mg C/kg)	366300	374500	382500	368400	384900	379100	386300	416300	375500	391200	404900	405600	368900	298402
N _i (mg N/kg)	50900	32700	26300	29700	31300	31100	60600	52500	66900	60000	75900	73300	50900	41780
Ratio C:N	7,20	11,5	14,5	12,4	12,3	12,2	6,37	7,93	5,61	6,52	5,33	5,53	7,25	7,14
COT (mg C/kg)	30124	58766	61100	85395	63834	62010	70834	51742	130312	93766	243226	50973	60675	nd
N-NH ₄ ⁺ (mg N/kg)	3806	5300	8393	4316	4789	4446	7535	26002	6351	6351	31974	8582	8380	979
N-org. (mg N/kg)	47094	27400	17907	25384	26511	26654	53065	26498	60549	53649	43926	64718	42520	40801
Al (mg/kg)	3127	nd	5987	34752	nd	14875	21002	nd	20010	38556	16203	4234	29956	5749
Ca (mg/kg)	21513	nd	18785	19686	nd	18733	15786	nd	13996	25477	12688	3461	24326	14762
Cd (mg/kg)	0,420	nd	1,02	1,97	nd	0,960	1,50	nd	1,30	2,38	1,18	0,210	2,51	0,390
Cr (mg/kg)	17,2	nd	24,0	106	nd	57,0	46,0	nd	71,7	128	38,3	12,3	70,3	24,0
Cu (mg/kg)	558	nd	462	353	nd	396	304	nd	244	442	220	44,0	296	189
Fe (mg/kg)	1810	nd	3457	16293	nd	10236	10445	nd	12135	22377	10425	635	17646	12001
K (mg/kg)	32040	nd	27340	8830	nd	10322	5600	nd	4816	10092	4463	1396	7147	9084
Mg (mg/kg)	11395	nd	9873	3982	nd	4987	3233	nd	2915	5208	2632	416	5735	nd
Mn (mg/kg)	453	nd	378	187	nd	239	156	nd	128	236	115	57,0	188	nd
Mo (mg/kg)	11,1	nd	10,3	7,56	nd	10,4	5,47	nd	4,67	8,28	3,77	1,39	6,28	nd
Na (mg/kg)	17212	nd	16555	148582	nd	86877	23309	nd	35235	96083	37147	12126	15117	1289
Ni (mg/kg)	12,5	nd	14,6	30,7	nd	24,0	10,3	nd	9,73	17,2	8,80	2,69	29,5	20,3
P (mg/kg)	12694	nd	11900	12541	nd	10455	8885	nd	9422	17964	8357	6000	8314	7975
Pb (mg/kg)	2,78	nd	4,44	32,0	nd	5,05	28,5	nd	29,1	46,6	18,6	3,52	111,1	27,6
S (mg/kg)	4469	nd	6052	47935	nd	8099	6543	nd	5281	20701	14404	488	3379	4779
Zn (mg/kg)	1804	nd	1788	844	nd	1388	668	nd	555	1108	480	90	1184	301
Période d'échantillonnage (mois/année)	07/01	09/01	06/02	04/02	07/02	04/03	07/01	09/01	06/02	04/02	05/02	09/02	04/03	06/03
Échantillon décanté ²	x	x	x	x	x	x	√	√	x	√	√	√	√	√
Échantillon concentré par centrifugation et homogénéisé ³	√	x	√	x	x	x	x	√	x	x	x	√	x	x

¹ Les teneurs sont présentées sur une base de boue sèche (g de boues sèches / l ou mg / kg de boues sèches).

² La majorité des boues secondaires ont été analysées après leur décantation.

³ Quelques boues mixtes et boues secondaires décantées ont été concentrées par centrifugation et homogénéisées avant leur analyse.

⁴ Les données sont celles de Brar et al. (2004). Les auteurs ont aussi mesuré la teneur en N-NO_x qui est égale à 16 mg N/kg boues sèches.

Principaux facteurs expliquant la variation des caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de la Station Est de la Ville de Québec.

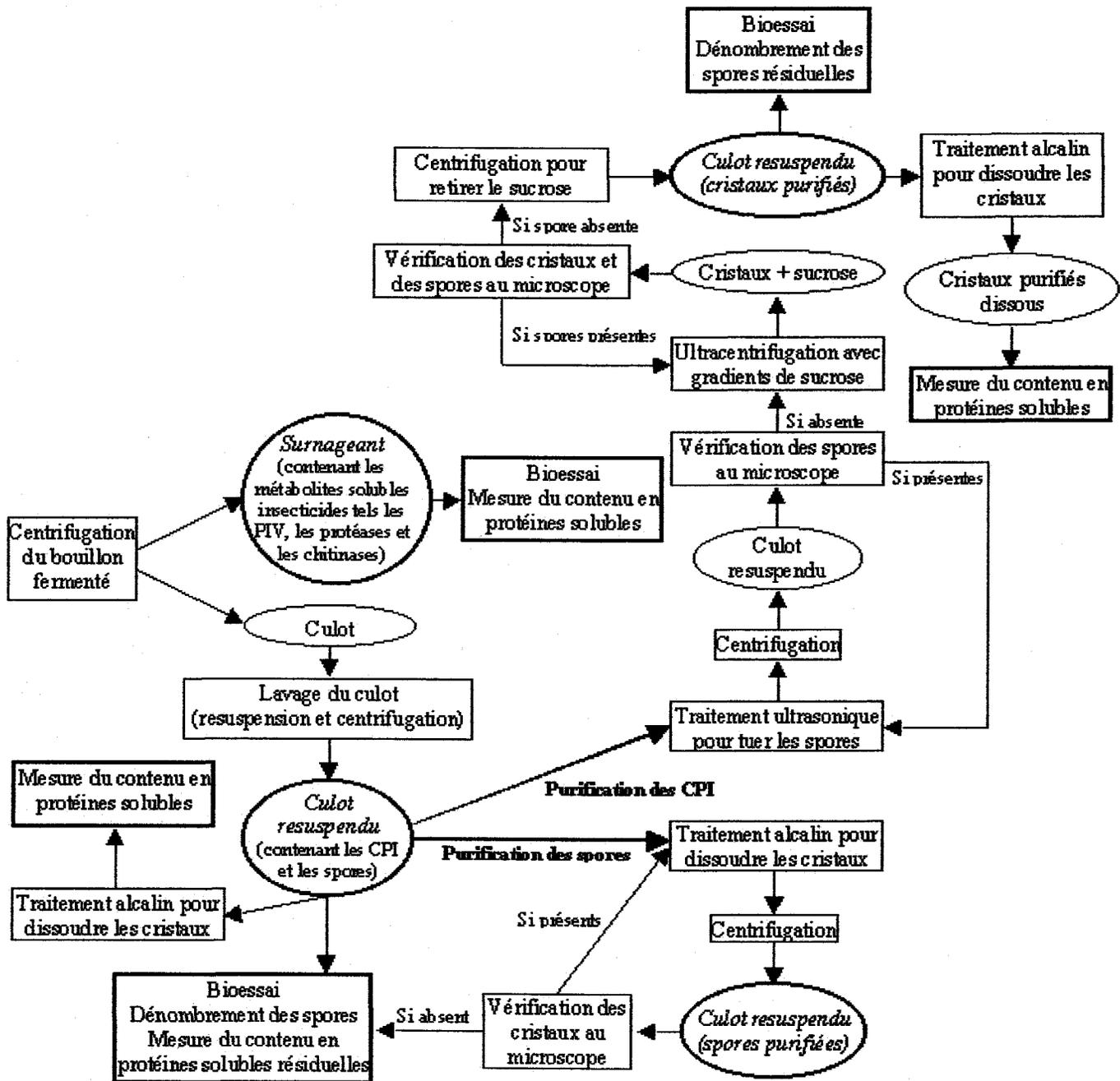
Facteurs	Explications
Variabilité saisonnière des affluents	La Station Est de la Ville de Québec dessert quatre arrondissement de la Ville de Québec, soit Québec, Beauport, Vanier et Charlebourg totalisant une population de 270 000 habitants environ. Les conduites du réseau d'interception des eaux usées de ces arrondissements sont de type unitaire. En plus de recevoir des eaux usées domestiques, ils reçoivent une partie des eaux usées pluviales et nuviales (Van Coillie et al., 2004). Les eaux usées pluviales et nuviales peuvent influencer le contenu en éléments inorganiques et en MES de l'affluent traité par la station d'épuration. La quantité et la composition des eaux usées pluviales et nuviales déversées dans les égouts varient selon les saisons. Par exemple, des sels sont appliqués sur les routes au cours de l'hiver et du printemps et ils peuvent être des constituants importants des eaux usées pluviales et nuviales.
Déversement d'effluents industriels dans les égouts	Quelques effluents industriels sont déversés dans les égouts de la Ville de Québec. Cet apport industriel est considéré comme faible par la Division du traitement des eaux de l'ancienne Communauté urbaine du Québec (Van Coillie et al., 2004). Ces effluents peuvent néanmoins influencer le contenu en éléments traces comme les métaux. Selon Van Coillie et al. (2004), trois industries de traitement des métaux et de placage ainsi qu'une tannerie génèrent des eaux usées avec de fortes teneurs en métaux. Les débits de ces eaux usées et leurs concentrations en métaux peuvent varier au cours de l'année selon le niveau d'activité des industries concernées. Cela peut par conséquent avoir une influence sur la teneurs en métaux dans l'affluent de la Station Est de la Ville de Québec et les boues qu'elle génère. Des industries agro-alimentaires (5), de bois de sciage (1), de bétons (3), du tabac (1) et de papiers et de cartons (2) ainsi que des buanderies (3) peuvent quant à elles déversées des eaux usées riches en MES et/ou en DBO ₅ susceptibles de contenir des éléments inorganiques adsorbés et des fortes teneurs en carbone organique. Cela pourrait alors influencer le contenu en éléments inorganiques ou en COT des affluents et des boues d'épuration.
Variabilité annuelle de la charge organique et inorganique de l'affluent	Les saisons ainsi que les activités humaines et industrielles sont différentes d'une année à l'autre. La Station Est de la Ville de Québec traite le même débit d'affluent à chaque année (entre 2,2 et 2,4 m ³ /s), mais les charges organiques et inorganiques des affluents varient. À titre d'exemple, les charges en MES et de DBO ₅ étaient en 1997 de 32 et 25 tonnes par jour respectivement alors qu'elles étaient de 43 et 31 tonnes par jour en 2000 (Van Coillie et al., 2004). Les MES sont susceptibles de contenir des éléments inorganiques adsorbés et du carbone organique alors que la DBO ₅ est un indice de la présence de forte teneur en carbone organique. Si leur concentration moyenne varie à chaque année, cela peut influencer les teneurs en éléments inorganiques et carbone organique.
Conditions d'entreposage, manipulations et âge des boues	Pour les teneurs en soufre et en ammonium présentées dans le Tableau 6, les conditions d'entreposage, les manipulations faites aux boues et leur âge peuvent entraîner des pertes en soufre sous forme de H ₂ S ou provoquer la volatilisation de l'ammonium (sous forme de N-NH ₃) suite à l'activité microbienne (même si la température n'est pas propice à la prolifération bactérienne).

**Composition du régime alimentaire pour l'élevage de tordeuse des bourgeons de l'épinette
(Division des forêts, Ministère des Ressources Naturelles du Québec). Quantité pour un litre.**

Ingrédient	Quantité
Agar (g)	16,7
Eau distillée (ml)	840
Caséine sans vitamine (g)	35
Hydroxide de potassium 4M (ml)	5
Alphacel (g)	5
Mélange de sels (Wesson) (g)	10
Sucrose (g)	35
Germe de blé (g)	45,7
Chloride choline (g)	1
Solution de vitamines ¹ (ml)	10
Acide ascorbique (g)	4
Formaline (37% formaldéhyde) (g)	0,5
Méthylparabène (g)	1,5
Poudre d'auréomycine (g)	5,6

¹ 100 ml contient : 100 mg de niacine, 100 mg de pentothénate de calcium, 50 mg de riboflavine, 25 mg d'hydrochloride de thiamine, 25 mg d'hydrochloride pyrodoxine, 25 mg d'acide folique, 2 mg de biotine et 0,2 mg de vitamine B-12.

Schéma des procédures utilisées pour obtenir (et analyser) le surnageant et le culot des bouillons fermentés ainsi que des suspensions de spores et de cristaux purifiés de Bt.



ANNEXE 7
Données des expériences préliminaires en
 fioles Erlenmeyer



Séquences des expériences préliminaires et les échantillons de boues associées.

No. séquence	Expériences réalisées	Boues utilisées*
1-BEM	<i>Cont25, Cont35, Ac25pH2 - Ac35pH4, Al25pH10 - Al35pH12, Th25t140 à Th35t180</i>	BEM 1
2-BEM	<i>Tha25t140 à Tha35t180, Oxy25c0,01 à Oxy35c0,05</i>	BEM 2
3-BEM	<i>Tho25c0.01 et Tho35c0.03</i>	BEM 2
4-BES	<i>Cont25, Cont35, Ac25pH2 - Ac35pH4, Al25pH10 - Al35pH12, Th25t140 à Th35t180</i>	BES 1
5-BES	<i>Tha25t140 à Tha35t180, Oxy25c0,01 à Oxy35c0,05</i>	BES 2
6-BES	<i>Tho25c0.01 et Tho35c0.03</i>	BES 2

* Voir l'Annexe 6 pour la composition des boues.

Données brutes des concentrations en spores viables et de l'entomotoxicité de Btk HD-1 des expériences préliminaires sur le traitement des boues d'épuration mixtes (BEM). Résultats après 48h de fermentation en fioles Erlenmeyer.

Code	Spores (UFCx10 ⁷ /ml)		Entomotoxicité (UI/μl)		Sporulation (%)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)	
	Valeur	Diff. (%)	Valeur	Diff. (%)		Valeur	Diff. (%)
<i>Cont25*</i>	9,5	x	10500	x	68	0,111	x
<i>Cont35*</i>	22,0	x	8228	x	85	0,037	x
<i>Ac25pH2</i>	12,5	32	8858	-16	69	0,071	-36
<i>Ac25pH4</i>	20,0	111	9227	-12	59	0,046	-58
<i>Ac35pH2</i>	22,0	0	10126	23	79	0,046	23
<i>Ac35pH4</i>	52,5	139	10708	30	97	0,020	-45
<i>Al25pH10</i>	27,5	189	9158	-13	95	0,033	-70
<i>Al25pH12</i>	15,0	58	10831	3	71	0,072	-35
<i>Al35pH10</i>	39,0	77	11907	45	87	0,031	-18
<i>Al35pH12</i>	22,0	0	10083	23	86	0,046	23
<i>Th25t140</i>	21,3	124	8282	-21	61	0,039	-65
<i>Th25t160</i>	29,0	205	4183	-60	62	0,014	-87
<i>Th25t180</i>	15,0	58	5288	-50	60	0,035	-68
<i>Th35t140</i>	24,0	9	5383	-35	59	0,022	-40
<i>Th35t160</i>	43,0	95	6035	-27	88	0,014	-62
<i>Th35t180</i>	40,3	83	7250	-12	102	0,018	-52
<i>Tha25t140</i>	28,0	195	16188	54	70	0,058	-48
<i>Tha25t160</i>	20,0	111	14884	42	94	0,074	-33
<i>Tha25t180</i>	31,0	226	10516	0	101	0,034	-69
<i>Tha35t140</i>	43,0	95	19110	132	87	0,044	19
<i>Tha35t160</i>	36,3	65	13363	62	75	0,037	-2
<i>Tha35t180</i>	26,0	18	7801	-5	103	0,030	-20
<i>Oxy25c0.01</i>	36,3	282	9341	-11	106	0,026	-77
<i>Oxy25c0.03</i>	18,3	93	7773	-26	76	0,042	-62
<i>Oxy25c0.05</i>	1,3	-86	6524	-38	43	0,502	354
<i>Oxy35c0.01</i>	39,7	80	11465	39	99	0,029	-23
<i>Oxy35c0.03</i>	37,3	70	10626	29	74	0,028	-24
<i>Oxy35c0.05</i>	4,0	-82	2047	-75	85	0,051	37
<i>Tho25c0.01</i>	17,5	84	12822	22	82	0,073	-34
<i>Tho25c0.03</i>	24,7	160	10832	3	73	0,044	-60
<i>Tho35c0.01</i>	48,0	118	19044	131	91	0,040	6
<i>Tho35c0.03</i>	10,7	-51	12235	49	48	0,114	206

* Moyenne de duplicata.

Données brutes des concentrations en spores viables et de l'entomotoxicité de Btk HD-1 des expériences préliminaires sur le traitement des boues d'épuration secondaires (BES). Résultats après 48h de fermentation en fioles Erlenmeyer. L'erreur de la méthode est de 8% pour le dénombrement des spores et 7% pour l'entomotoxicité (bio-essais).

Code	Spores (UFCx10 ⁷ /ml)		Entomotoxicité (UI/μl)		Sporulation	Ratio Tx/spores (UI/ 1x10 ³ UFC)	
	Valeur	Diff. (%)	Valeur	Diff. (%)	(%)	Valeur	Diff. (%)
Cont25*	15,0	x	11188	x	60	0,075	x
Cont35*	14,0	x	7649	x	47	0,055	x
Ac25pH2	28,5	90	10643	-5	86	0,037	-50
Ac25pH4	56,0	273	10457	-7	84	0,019	-75
Ac35pH2	25,0	79	9707	27	49	0,039	-29
Ac35pH4	21,0	50	11227	47	80	0,053	-2
Al25pH10	28,7	91	10991	-2	84	0,038	-49
Al25pH12	23,0	53	8489	-24	72	0,037	-51
Al35pH10	24,7	76	18360	140	53	0,074	36
Al35pH12	48,0	243	9246	21	76	0,019	-65
Th25t140	34,0	127	10099	-10	71	0,030	-60
Th25t160	36,0	140	9118	-19	72	0,025	-66
Th25t180	32,0	113	8196	-27	94	0,026	-66
Th35t140	47,0	236	9272	21	81	0,020	-64
Th35t160	50,0	257	10635	39	73	0,021	-61
Th35t180	42,0	200	6488	-15	82	0,015	-72
Tha25t140	34,3	129	12567	12	61	0,037	-51
Tha25t160	43,0	187	12556	12	90	0,029	-61
Tha25t180	58,0	287	10605	-5	98	0,018	-75
Tha35t140	37,5	168	12641	65	71	0,034	-38
Tha35t160	55,0	293	10711	40	79	0,019	-64
Tha35t180	35,0	150	8750	14	71	0,025	-54
Oxy25c0.01	41,5	177	10039	-10	75	0,024	-68
Oxy25c0.03	13,0	-13	8262	-26	53	0,064	-15
Oxy25c0.05	0,3	-98	5596	-50	8	1,865	2401
Oxy35c0.01	46,0	229	9369	22	110	0,020	-63
Oxy35c0.03	0,7	-95	10525	38	57	1,504	2652
Oxy35c0.05	0,7	-95	1799	-76	54	0,257	370
Tho25c0.01	34,0	127	12601	13	78	0,037	-50
Tho25c0.03	39,0	160	10671	-5	68	0,027	-63
Tho35c0.01	51,7	269	14630	91	78	0,028	-48
Tho35c0.03	39,3	181	13097	71	86	0,033	-39

* Moyenne de duplicata.

Contrôles négatifs des essais préliminaires en fioles Erlenmeyer. Boues stériles contenant 25 g MES/l, mais non fermentées par Btk HD-1.

Boue	% mortalité après 7 jours ^a	Entomotoxicité (UIx10 ³ /μl) ^b
BEM1	8	0,4
BEM2	0	0
BES1	4	0
BES2	4	0

^a Pourcentage de mortalité chez 25 individus (larves de *C. fumiferena*) après 7 jours avec un échantillon de boues stériles non dilués.

^b Entomotoxicités mesurées sur des boues diluées 1:999, 1:9999 et 1:99999.

Données brutes sur les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes (BEM) ou secondaires (BES) traitées et non traitées.

Boue	Traitements	ST		SVT		Rapport	MES		MVES		Rapport
		Valeur (g/l)	Diff. (%)	Valeur (g/l)	Diff. (%)	SVT/ST	Valeur (g/l)	Diff. (%)	Valeur (g/l)	Diff. (%)	MVES/MES
BEM	<i>Cont35</i>	36,3		27,6		0,76	35,0		27,0		0,77
	<i>Ac35pH2</i>	38,8	6,9	31,0	12,3	0,80	33,0	-5,7	24,1	-10,7	0,73
	<i>Al35pH10</i>	34,1	-6,1	28,7	4,0	0,84	33,1	-5,4	24,6	-8,9	0,74
	<i>Th35t140</i>	37,5	3,3	27,8	0,7	0,74	32,3	-7,7	24,2	-10,4	0,75
	<i>Tha35t140</i>	39,1	7,7	29,6	7,2	0,76	31,8	-9,1	23,7	-12,2	0,75
	<i>O35c0.01</i>	38,0	4,7	31,3	13,4	0,82	32,5	-7,1	24,6	-8,9	0,76
	<i>Tho35c0.01</i>	41,7	14,9	31,0	12,3	0,74	31,4	-10,3	22,4	-17,0	0,71
BES	<i>Cont35</i>	35,7		19,1		0,54	35,0		19,8		0,57
	<i>Ac35pH2</i>	32,8	-8,1	17	-11,0	0,52	30,4	-13,1	16,0	-19,2	0,53
	<i>Al35pH10</i>	34,1	-4,5	17,9	-6,3	0,52	33,5	-4,3	18,4	-7,1	0,55
	<i>Th35t140</i>	35,6	-0,3	16,8	-12,0	0,47	30,9	-11,7	16,8	-15,2	0,54
	<i>Tha35t140</i>	38,4	7,6	15,7	-17,8	0,41	29,9	-14,6	15,4	-22,2	0,52
	<i>O35c0.01</i>	39,1	9,5	18	-5,8	0,46	32,4	-7,4	16,9	-14,6	0,52
	<i>Tho35c0.01</i>	31	-13,2	16,6	-13,1	0,54	21,1	-39,7	10,9	-44,9	0,52

Boue	Traitements	COD		C total		N total		Ratio C:N	Viscosité			
		Valeur (mg/l)	Diff. (%)	Détecté (%)	Valeur (mg C /kg)	Diff. (%)	Détecté (%)		Valeur (mg N /kg)	Diff. (%)	Valeur (cP)	Diff. (%)
BEM	<i>Cont35</i>	2738		38,12	381200		2,52	25200		15,13	515	
	<i>Ac35pH2</i>	4442	62	28,94	289400	-24	2,30	23000	-9	12,58	330	-35,9
	<i>Al35pH10</i>	4190	53	35,15	351500	-8	2,28	22800	-10	15,42	345	-33,0
	<i>Th35t140</i>	2918	7	37,81	378100	-1	2,45	24500	-3	15,43	450	-12,6
	<i>Tha35t140</i>	4297	57	36,62	366200	-4	2,15	21500	-15	17,03	375	-27,2
	<i>O35c0.01</i>	2311	-16	33,16	331600	-13	2,49	24900	-1	13,32	285	-44,7
	<i>Tho35c0.01</i>	4836	77	30,93	309300	-19	2,27	22700	-10	13,63	235	-54,4
BES	<i>Cont35</i>	4976		32,60	326000		5,32	53200		6,13	102	
	<i>Ac35pH2</i>	4391	-12	23,56	235600	-28	3,98	39800	-25	5,92	47	-53,9
	<i>Al35pH10</i>	6758	36	31,04	310400	-5	4,55	45500	-14	6,82	42	-58,8
	<i>Th35t140</i>	4268	-14	33,36	333600	2	5,34	53400	0	6,25	60	-41,2
	<i>Tha35t140</i>	6537	31	36,62	366200	12	4,66	46600	-12	7,86	26	-74,5
	<i>O35c0.01</i>	4785	-4	26,77	267700	-18	4,40	44000	-17	6,08	25	-75,5
	<i>Tho35c0.01</i>	5940	19	25,54	255400	-22	4,12	41200	-23	6,2	31	-69,6

Données brutes sur les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes (BEM) ou secondaires (BES) traitées et non traitées.

Boue	Traitements	MES (0 jour)	MES (5 jours)	MVES (0 jour)	MVES (5 jours)	MVES dégradés après 5 jours	
		Valeur (g/l)	Valeur (g/l)	Valeur (g/l)	Valeur (g/l)	Valeur (%)	Différence par rapport au contrôle (%)
BEM	Cont35	36,3	34,8	27,3	25,2	-7,7	
	Ac35pH2	43,2	40,5	25,1	22,3	-11,2	3,5
	Al35pH10	38,9	34,5	27,3	22,5	-17,6	9,9
	Th35t140	37,7	30,3	28,6	21,2	-25,9	18,2
	Tha35t140	37,6	32,9	26,4	22,2	-15,9	8,2
	O35c0.01	40,5	35,3	27,5	22,8	-17,1	9,4
	Tho35c0.01	42,4	38,0	26,6	22,0	-17,3	9,6
BES	Cont35	29,9	24,4	17,1	11,2	-34,7	
	Ac35pH2	29,1	30,7	15,9	13,8	-12,8	-21,9
	Al35pH10	27,8	23,8	15,0	11,0	-26,7	-8,0
	Th35t140	27,5	23,6	14,8	10,5	-29,0	-5,7
	Tha35t140	22,6	21,3	10,9	9,5	-12,6	-22,0
	O35c0.01	28,3	20,5	16,0	9,9	-38,4	3,7
	Tho35c0.01	26,0	21,1	14,6	11,3	-22,2	-12,5

Boue	Traitements	N-NH ₄ ⁺			N organique + N-NO _x		Protéines solubles		
		Valeur (mg N/l)	Valeur (mg N / kg)	Diff. (%)	Valeur (mg N / kg)	Diff. (%)	Valeur (mg / ml)	Valeur (mg / kg)	Diff. (%)
BEM	Cont35	139,1	3832,1		21367,9		0,35	9,64	
	Ac35pH2	90,5	2332,9	-39,1	20667,1	-3,3	0,32	8,25	-14,5
	Al35pH10	363,6	10662,3	178,2	12137,7	-43,2	0,62	18,18	88,6
	Th35t140	113,0	3014,1	-21,3	21485,9	0,6	0,47	12,53	30,0
	Tha35t140	94,7	2423,0	-36,8	19077,0	-10,7	0,75	19,18	98,9
	O35c0.01	95,3	2507,8	-34,6	22392,2	4,8	0,3	7,89	-18,1
	Tho35c0.01	129,7	3109,6	-18,9	19590,4	-8,3	0,92	22,06	128,8
BES	Cont35	260,3	7290,3		45909,7		0,15	4,20	
	Ac35pH2	1033,4	31551,0	332,8	8249,0	-82,0	0,14	4,27	1,6
	Al35pH10	162,1	4761,5	-34,7	40738,5	-11,3	0,27	7,92	88,4
	Th35t140	300,2	8433,0	15,7	44967,0	-2,1	0,36	10,11	140,7
	Tha35t140	244,5	6367,1	-12,7	40232,9	-12,4	0,83	21,61	414,4
	O35c0.01	184,8	4725,3	-35,2	39274,7	-14,5	0,25	6,39	52,2
	Tho35c0.01	237,3	7654,9	5,0	33545,1	-26,9	0,2	6,45	53,5

Données brutes sur les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes (BEM) ou secondaires (BES) traitées et non traitées.

Boue	Pré-trait.	Al ³⁺		Cd ²⁺		Cr ³⁺		Cu ²⁺		Fe ^{2+ et 3+}		Mn ²⁺		Mo ⁶⁺	
		mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)
BEM	<i>Cont35</i>	1,27		<0,0008	x	0,01		0,01		3,18		0,33		0,02	
	<i>Ac35pH2</i>	1,61	26,73	<0,0008	x	0,02	61,47	0,00	-75,69	21,65	580,98	1,42	333,04	0,04	71,97
	<i>Al35pH10</i>	5,97	368,66	<0,0008	x	0,12	991,74	0,15	941,67	7,33	130,66	0,13	-60,40	0,10	336,40
	<i>Th35t140</i>	2,20	72,91	<0,0008	x	0,05	352,29	0,04	170,83	17,47	449,60	0,48	46,50	0,05	89,54
	<i>Tha35t140</i>	7,68	503,10	<0,0008	x	0,05	353,21	0,14	850,00	6,68	110,08	0,13	-59,33	0,06	135,56
	<i>O35c0.01</i>	0,19	-85,07	<0,0008	x	0,01	-18,35	0,03	92,36	3,05	-4,18	0,25	-24,47	0,03	19,67
	<i>Tho35c0.01</i>	3,98	212,63	<0,0008	x	0,04	282,57	0,01	-27,08	17,55	452,09	0,91	175,93	0,04	58,58
BES	<i>Cont35</i>	4,06		<0,0008		0,03		0,02		17,35		0,21		0,07	
	<i>Ac35pH2</i>	3,97	-2,24	<0,0008	x	0,04	33,72	0,23	854,66	9,35	-46,09	0,07	-65,67	0,13	72,95
	<i>Al35pH10</i>	1,98	-51,23	<0,0008	x	0,02	-38,74	0,54	2181,36	45,67	163,24	1,08	421,52	0,08	13,35
	<i>Th35t140</i>	2,37	-41,76	<0,0008	x	0,03	-20,34	0,02	-35,17	9,45	-45,53	0,07	-65,83	0,12	59,18
	<i>Tha35t140</i>	23,47	477,92	0,0010	23	0,15	373,35	0,72	2942,37	27,94	61,05	0,26	23,84	0,15	102,72
	<i>O35c0.01</i>	1,82	-55,09	<0,0008	x	0,01	-54,83	1,30	5403,81	21,52	24,02	0,80	285,74	0,08	13,48
	<i>Tho35c0.01</i>	2,65	-34,69	<0,0008	x	0,04	31,10	3,94	16589,41	24,99	44,05	0,59	184,19	0,11	47,07

Boue	Pré-trait.	Ni ²⁺		Pb ²⁺		Zn ²⁺	
		mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)
BEM	<i>Cont35</i>	0,04		<0,015		0,03	
	<i>Ac35pH2</i>	0,03	-11,45	<0,015	x	0,31	989,82
	<i>Al35pH10</i>	0,07	83,80	0,02	35,92	0,22	656,84
	<i>Th35t140</i>	0,03	-19,83	<0,015	x	0,08	188,77
	<i>Tha35t140</i>	0,07	99,16	0,03	111,27	0,21	643,16
	<i>O35c0.01</i>	0,07	98,04	0,02	19,97	0,05	80,70
	<i>Tho35c0.01</i>	0,07	101,68	0,02	4,62	0,28	896,49
BES	<i>Cont35</i>	0,04		<0,015		0,12	
	<i>Ac35pH2</i>	0,06	43,73	<0,015	x	0,26	123,19
	<i>Al35pH10</i>	0,02	-57,05	<0,015	x	0,28	137,46
	<i>Th35t140</i>	0,05	11,14	<0,015	x	0,11	-9,32
	<i>Tha35t140</i>	0,09	118,77	<0,015	x	0,85	623,17
	<i>O35c0.01</i>	0,02	-45,65	<0,015	x	0,31	165,12
	<i>Tho35c0.01</i>	0,06	44,86	<0,015	x	0,70	497,17

Données brutes sur les caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes (BEM) ou secondaires (BES) traitées et non traitées.

Boue	Traitements	Ca ²⁺		K ⁺		Mg ²⁺		Na ⁺		P inorganique		S inorganique	
		mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)	mg/l	Diff. (%)
BEM	<i>Cont35</i>	102,92		52,98		19,74		257,90		39,14		732,73	
	<i>Ac35pH2</i>	365,50	255,13	57,83	9,16	40,07	103,04	2014,45	681,10	72,51	85,27	1218,10	66,24
	<i>Al35pH10</i>	34,23	-66,74	61,17	15,45	7,47	-62,16	1464,03	467,67	37,46	-4,29	310,95	-57,56
	<i>Th35t140</i>	137,01	33,12	63,38	19,63	24,70	25,16	232,00	-10,04	42,66	8,99	48,13	-93,43
	<i>Tha35t140</i>	33,91	-67,05	57,39	8,33	4,33	-78,07	2949,23	1043,55	100,64	157,14	1960,80	167,60
	<i>O35c0.01</i>	210,35	104,38	60,22	13,67	43,68	121,33	1400,23	442,93	7,45	-80,95	1168,80	59,51
	<i>Tho35c0.01</i>	314,30	205,38	77,03	45,40	46,10	133,57	2882,88	1017,83	77,41	97,78	3041,20	315,05
BES	<i>Cont35</i>	48,03		148,52		36,22		250,02		125,39		36,94	
	<i>Ac35pH2</i>	9,80	-79,59	139,58	-6,02	4,14	-88,57	1138,50	355,36	99,86	-20,36	68,24	84,74
	<i>Al35pH10</i>	279,32	481,54	130,38	-12,21	63,09	74,18	2244,40	797,69	145,36	15,93	1175,10	3081,02
	<i>Th35t140</i>	16,04	-66,61	139,99	-5,74	21,25	-41,32	565,56	126,21	129,22	3,05	96,08	160,09
	<i>Tha35t140</i>	27,45	-42,85	139,80	-5,87	11,97	-66,94	1065,40	326,13	180,30	43,79	188,82	411,14
	<i>O35c0.01</i>	220,00	358,04	140,69	-5,27	60,25	66,36	1175,90	370,32	137,12	9,35	534,22	1346,14
	<i>Tho35c0.01</i>	158,26	229,50	150,73	1,49	52,30	44,41	1929,30	671,66	104,12	-16,96	838,04	2168,59

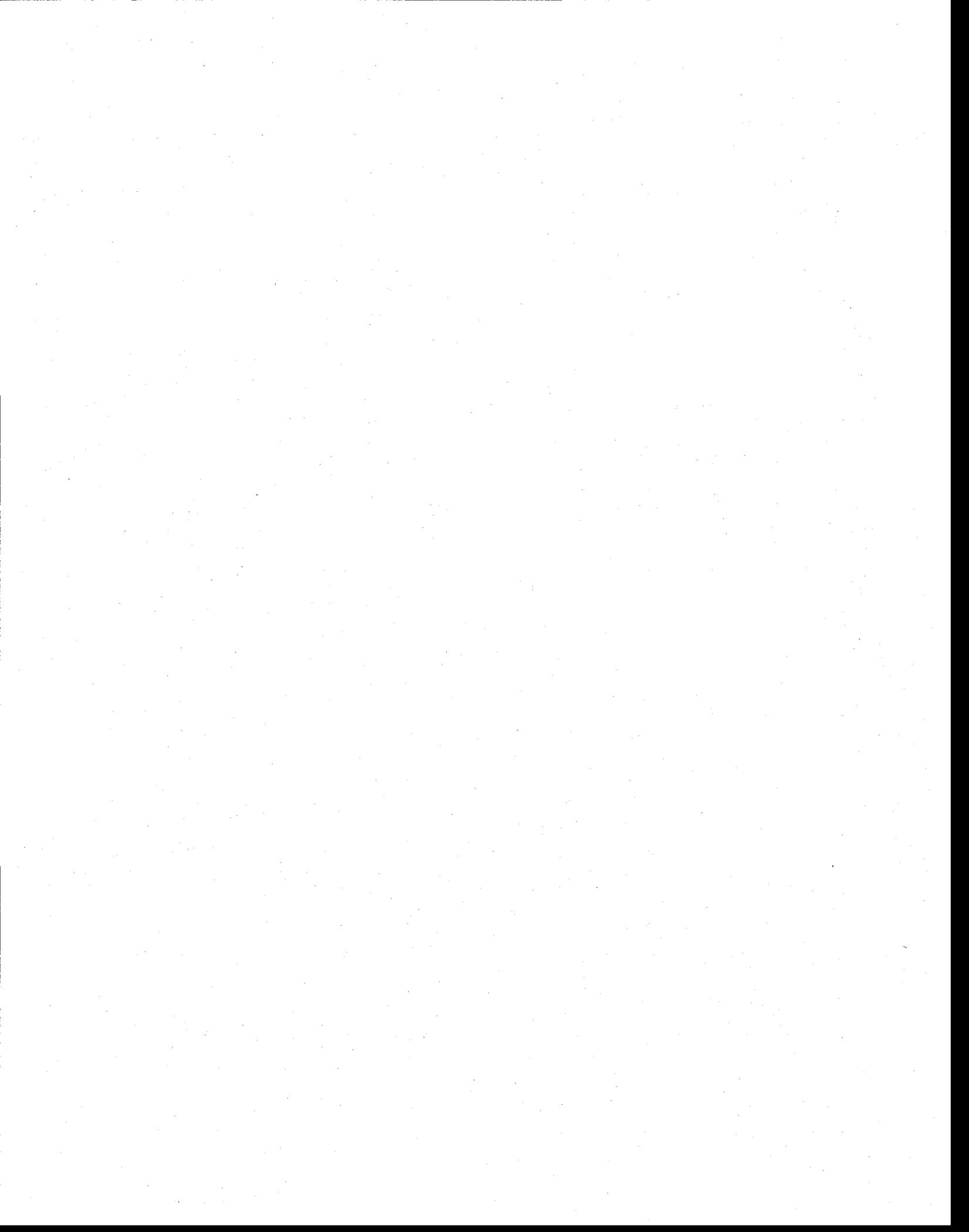
Récapitulation des effets des traitements sur les boues épaissies (BEM) et secondaires (BES) ainsi que sur la production de spores et l'entomotoxicité de Btk HD-1. Les valeurs correspondent à l'écart relatif (%) par rapport au contrôle (Cont35) calculé avec les données brutes.

Paramètres analysés	Variations des paramètres en pourcentage (%) selon les traitements et le type de boue											
	Ac35pH2		Al35pH10		Th35t140		Tha35t140		O35c0.01		Tho35c0.01	
	BEM	BES	BEM	BES	BEM	BES	BEM	BES	BEM	BES	BEM	BES
C-total	-24,1	-27,7	-7,8	-4,8	-0,8	2,3	-3,9	12,3	-13	-17,9	-18,9	-21,7
COD	62,2	-11,8	53	35,8	6,6	-14,2	56,9	31,4	-15,6	-3,8	76,6	19,4
%MVES	3,5	-21,9	9,9	-8	18,2	-5,7	8,2	-22	9,4	3,7	9,6	-12,5
DCO soluble	-18,8	9,7	96,2	50,8	-22,1	85,1	105,9	130,8	-15,6	27,7	-5,2	100
Viscosité	-35,9	-53,9	-33	-58,8	-12,6	-41,2	-27,2	-74,5	-44,7	-75,5	-54,4	-69,6
N-NH ₄ ⁺	-39,1	332,8	178,2	-34,7	-21,3	15,7	-36,8	-12,7	-34,6	-35,2	-18,9	5
N _{organique}	-3,3	-82	-43,2	-11,3	0,6	-2,1	-10,7	-12,4	4,8	-14,5	-8,3	-26,9
N _t	-8,7	-25,2	-9,5	-14,5	-2,8	0,4	-14,7	-12,4	-1,2	-17,3	-9,9	-22,6
Prot. totales	-65,4	-55	-30,6	6,1	-51,1	-63,1	-43	-10,8	-26,8	-41,5	-24,8	-78,5
Prot. dissoutes	-14,5	1,6	88,6	88,4	30	140,7	98,9	414,4	-18,1	52,2	128,8	53,5
C : N	12,6	5,9	15,4	6,8	15,4	6,3	17	7,9	13,3	6,1	13,6	6,2
MES	-5,7	-13,1	-5,4	-4,3	-7,7	-11,7	-9,1	-14,6	-7,1	-7,4	-10,3	-39,7
MVES	-10,7	-19,2	-8,9	-7,1	-10,4	-15,2	-12,2	-22,2	-8,9	-14,6	-17	-44,9
Al ³⁺	26,7	-2,2	368,7	-51,2	72,9	-41,8	503,1	477,9	-85,1	-55,1	212,6	-34,7
Fe ²⁺ et ³⁺	581	-46,1	130,7	163,2	449,6	-45,5	110,1	61,1	-4,2	24	452,1	44
Cu ²⁺	-75,7	854,7	941,7	2181,4	170,8	-35,2	850	2942,4	92,4	5403,8	-27,1	16589,4
Mn ²⁺	333	-65,7	-60,4	421,5	46,5	-65,8	-59,3	23,8	-24,5	285,7	175,9	184,2
Mo ⁶⁺	72	72,9	336,4	13,4	89,5	59,2	135,6	102,7	19,7	13,5	58,6	47,1
Zn ²⁺	989,8	123,2	656,8	137,5	188,8	-9,3	643,2	623,2	80,7	165,1	896,5	497,2
Ca ²⁺	255,1	-79,6	-66,7	481,5	33,1	-66,6	-67,1	-42,8	104,4	358	205,4	229,5
P _i	85,3	-20,4	-4,3	15,9	9	3,1	157,1	43,8	-81	9,4	97,8	-17
Na ⁺	681,1	355,4	467,7	797,7	-10	126,2	1043,6	326,1	442,9	370,3	1017,8	671,7
S _i	66,2	84,7	-57,6	3081	-93,4	160,1	167,6	411,1	59,5	1346,1	315,1	2168,6
K ⁺	9,2	-6	15,5	-12,2	19,6	-5,7	8,3	-5,9	13,7	-5,3	45,4	1,5
Mg ²⁺	103	-88,6	-62,2	74,2	25,2	-41,3	-78,1	-66,9	121,3	66,4	133,6	44,4
C _t	-24,1	-27,7	-7,8	-4,8	-0,8	2,3	-3,9	12,3	-13	-17,9	-18,9	-21,7
COD	62,2	-11,8	53	35,8	6,6	-14,2	56,9	31,4	-15,6	-3,8	76,6	19,4
Spores produites	0	79	77	76	9	236	95	168	80	229	118	269
Entomotoxicité	23	27	45	140	-35	21	132	65	39	22	131	91

Récapitulation des effets des traitements sur les boues épaissies (BEM) et secondaires (BES) par ordre de grandeur.

Effet	Boues	Traitements
Augmentation du COD	BEM	<i>Tho35c0.01 > Ac35pH2 > Tha35t140 > Al35pH10 > Th35t140 > Oxy35c0.01</i>
	BES	<i>Al35pH10 > Tha35t140 > Tho35c0.01 > O35c0.01 > Ac35pH2 > Th35t140</i>
Diminution du C _t	BEM	<i>Ac35pH2 > Tho35c0.01 > O35c0.01 > Al35pH10 > Tha35t140 > Th35t140</i>
	BES	<i>Ac35pH2 > Tho35c0.01 > O35c0.01 > Al35pH10 > Th35t140 > Tha35t140</i>
Pourcentage de MVES dégradées après 5 jours	BEM	<i>Th35t140 > Al35pH10 ≈ Tho35c0.01 ≈ O35c0.01 ≈ Tha35t140 > Ac35pH2</i>
	BES	<i>Tha35t140 ≈ Ac35pH2 > Tho35c0.01 > Al35pH10 > Th35t140 > O35c0.01</i>
Diminution de la viscosité	BEM	<i>Tho35c0.01 > O35c0.01 > Ac35pH2 ≈ Al35pH10 > Tha35t140 > Th35t140</i>
	BES	<i>O35c0.01 ≈ Tha35t140 > Tho35c0.01 > Al35pH10 > Ac35pH2 > Th35t140</i>
Augmentation en N-NH ₄ ⁺	BEM	<i>Al35pH10 > Tho35c0.01 ≈ Th35t140 > O35c0.01 ≈ Tha35t140 ≈ Ac35pH2</i>
	BES	<i>Ac35pH2 > Th35t140 > Tho35c0.01 > Tha35t140 > Al35pH10 ≈ O35c0.01</i>
Diminution de N _t	BEM	<i>Tha35t140 > Tho35c0.01 ≈ Al35pH10 ≈ Ac35pH2 > Th35t140 ≈ O35c0.01</i>
	BES	<i>Ac35pH2 > Tho35c0.01 > O35c0.01 > Al35pH10 > Tha35t140 > Th35t140</i>
Diminution de N _{organique} +N-NO _x	BEM	<i>Al35pH10 > Tha35t140 ≈ Tho35c0.01 > Ac35pH2 > Th35t140 > O35c0.01</i>
	BES	<i>Ac35pH2 > Tho35c0.01 > O35c0.01 > Tha35t140 ≈ Al35pH10 > Th35t140</i>
Augmentation en protéines dissoutes	BEM	<i>Tho35c0.01 > Tha35t140 > Al35pH10 > Th35t140 > Ac35pH2 > O35c0.01</i>
	BES	<i>Tha35t140 > Th35t140 > Al35pH10 > Tho35c0.01 ≈ O35c0.01 > Ac35pH2</i>

ANNEXE 8
Données des travaux d'optimisation



Échantillons de boues utilisées pour les travaux d'optimisation et les expériences de validation en fioles Erlenmeyer.

Boues*	Expériences
BES4	Optimisation ALS
BEM4	Optimisation TAM
BES5	Optimisation TAS
BEM5	Optimisation TOM
BES6	Optimisation TOS

* Voir l'Annexe 6 pour la composition des boues.

Données brutes pour l'optimisation de l'hydrolyse alcaline des boues secondaires. Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

Code	Entomotoxicité (UI/ μ l)			Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)			Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)			Sporulation (%)	Ratio <i>Tx/spores</i> (UI/1x10 ³ UFC)
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle		
ALSK1	10564	11626	-1062	34,0	42,3	-8,3	24,0	24,5	-0,5	70,6	0,044
ALSK2	11990	13134	-1144	40,0	73,2	-33,2	33,0	55,7	-22,7	82,5	0,036
ALSK3	10485	10158	327	51,0	67,0	-16,0	33,0	54,2	-21,2	64,7	0,032
ALSK4	11142	11336	-194	22,0	21,2	0,8	10,0	20,9	-10,9	45,5	0,111
ALSK5	13561	12592	969	51,0	50,5	0,5	26,0	25,5	0,5	51,0	0,052
ALSK6	14221	13605	616	40,0	64,7	-24,7	14,0	38,2	-24,2	35,0	0,102
ALSK7	15950	15277	673	74,0	109,5	-35,5	53,0	77,2	-24,2	71,6	0,030
ALSK8	14110	15959	-1850	80,0	46,9	33,1	51,0	25,4	25,6	63,8	0,028
ALSK9	18683	15444	3239	61,0	65,0	-4,0	31,0	33,5	-2,5	50,8	0,060
ALSK10	12548	14509	-1961	121,0	122,2	-1,2	107,0	104,7	2,3	88,4	0,012
ALSK11	11154	13058	-1904	79,0	91,0	-12,0	53,0	50,7	2,3	67,1	0,021
ALSK12	12214	11793	420	100,0	71,4	28,6	80,0	57,4	22,6	80,0	0,015
ALSK13	14999	16093	-1094	57,0	94,5	-37,5	51,0	62,0	-11,0	89,5	0,029
ALSK14	15727	14664	1063	180,0	134,9	45,1	159,0	114,7	44,3	88,3	0,010
ALSK15	20394	17861	2533	217,0	154,7	62,3	147,0	101,2	45,8	67,7	0,014
ALSK16	15876	16101	-225	90,0	118,3	-28,3	68,0	89,4	-21,4	75,6	0,023
ALSE1	13691	12808	883	40,0	2,1	37,9	39,0	-0,4	39,4	97,5	0,035
ALSE2	15783	16767	-985	66,0	96,3	-30,3	32,0	72,6	-40,6	48,5	0,049
ALSE3	12287	11097	1190	96,0	77,1	18,9	95,0	79,1	15,9	99,0	0,013
ALSE4	15078	16370	-1292	121,0	132,3	-11,3	95,0	112,1	-17,1	78,5	0,016
ALSE5	13162	13423	-262	67,0	39,1	27,9	32,0	24,4	7,6	47,8	0,041
ALSE6	13552	13392	160	27,0	47,3	-20,3	20,0	28,7	-8,7	74,1	0,068
ALSE7	12211	14000	-1789	159,0	137,5	21,5	72,0	65,9	6,1	45,3	0,017
ALSE8	15436	13748	1688	118,0	132,0	-14,0	78,0	85,3	-7,3	66,1	0,020
ALSC1	15921	13645	2275	49,0	46,6	2,4	28,0	22,7	5,3	57,1	0,057
ALSC2	12703	13645	-943	47,0	46,6	0,4	16,0	22,7	-6,7	34,0	0,079
ALSC3	12729	13645	-916	34,0	46,6	-12,6	17,0	22,7	-5,7	50,0	0,075
ALSC4	12978	13645	-668	21,0	46,6	-25,6	12,0	22,7	-10,7	57,1	0,108
ALSC5	13338	13645	-308	42,0	46,6	-4,6	16,0	22,7	-6,7	38,1	0,083
ALSC6	13682	13645	37	70,0	46,6	23,4	46,0	22,7	23,3	65,7	0,030
ALSC7	14167	13645	522	63,0	46,6	16,4	24,0	22,7	1,3	38,1	0,059

Données complètes de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour l'hydrolyse alcaline des BES vis-à-vis l'entomotoxicité. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001, 0.01$ ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse. $R^2 = 0,63$.

Composantes	SE	d.l.	ME	F	p
Constante					
X_1	23510428	1	23510428	18,2730	0,0052
X_1^2	2332694	1	2332694	1,8130	0,2268
X_2	41714582	1	41714582	32,4218	0,0013
X_2^2	13830	1	13830	0,0107	0,9208
X_3	1486	1	1486	0,0012	0,9740
X_3^2	101105	1	101105	0,0786	0,7886
X_4	94966	1	94966	0,0738	0,7950
X_4^2	93608	1	93608	0,0728	0,7964
$X_1 * X_2$	99719	1	99719	0,0775	0,7901
$X_1 * X_3$	841822	1	841822	0,6543	0,4495
$X_1 * X_4$	5965160	1	5965160	4,6363	0,0748
$X_2 * X_3$	17248455	1	17248455	13,4060	0,0106
$X_2 * X_4$	244860	1	244860	0,1903	0,6779
$X_3 * X_4$	109204	1	109204	0,0849	0,7806
Modèle de régression	92433817	14	6602416	1,9779	0,0959
Résiduelle	53410631	16	3338164		
Manque d'ajustement	45690906	10	4569091	3,5512	0,0672
Erreur pure	7719724	6	1286621		
Totale	145844448	30			

Analyse de la variance (ANOVA) et de la régression des résultats du modèle mathématique pour l'hydrolyse alcaline des BES vis-à-vis les comptes totaux et le nombre de spores produites. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse.

Effets	Comptes totaux									Spores viables								
	ANOVA, $R^2 = 0.65$					Coefficients régression (β)				ANOVA, $R^2 = 0.71$					Coefficients régression (β)			
	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p		
Constant						64480.97	0.5744	0.5737						2231.32	1.2810	0.2185		
X_1	x	x	x	x	x	839.34	0.4650	0.6482	7994	1	7994	9.9467	0.0061	-23.96	-0.8555	0.4049		
X_1^2	13301	1	13301	48.1423	0.0004	11.42	0.8359	0.4155	319	1	319	0.3975	0.5373	0.13	0.6305	0.5373		
X_2	12	1	12	0.0450	0.8391	-10285.96	-1.0575	0.3060	1634	1	1634	2.0326	0.1732	-442.47	-2.9318	0.0098		
X_2^2	4565	1	4565	16.5229	0.0066	21.99	0.0644	0.9495	9490	1	9490	11.8089	0.0034	18.22	3.4364	0.0034		
X_3	6041	1	6041	21.8639	0.0034	-2744.91	-0.6666	0.5145	28	1	28	0.0350	0.8538	16.60	0.2598	0.7983		
X_3^2	100	1	100	0.3621	0.5694	-9.51	-0.1740	0.8640	27	1	27	0.0333	0.8575	0.15	0.1825	0.8575		
X_4	20	1	20	0.0732	0.7958	1438.28	0.6511	0.5242	561	1	561	0.6977	0.4159	3.99	0.1165	0.9087		
X_4^2	45	1	45	0.1642	0.6993	3.58	0.1675	0.8691	4996	1	4996	6.2162	0.0240	0.83	2.4932	0.0240		
$X_1 * X_2$	13883	1	13883	50.2503	0.0004	-15.79	-0.1728	0.8649	756	1	756	0.9410	0.3464	1.37	0.9701	0.3464		
$X_1 * X_3$	452	1	452	1.6344	0.2483	-18.35	-0.5022	0.6224	156	1	156	0.1944	0.6652	-0.25	-0.4409	0.6652		
$X_1 * X_4$	2	1	2	0.0057	0.9425	-30.53	-1.3368	0.2000	1600	1	1600	1.9910	0.1774	0.50	1.4110	0.1774		
$X_2 * X_3$	689	1	689	2.4940	0.1654	415.31	2.2731	0.0372	484	1	484	0.6023	0.4490	2.20	0.7761	0.4490		
$X_2 * X_4$	1173	1	1173	4.2458	0.0850	-30.93	-0.2708	0.7900	342	1	342	0.4259	0.5233	-1.16	-0.6526	0.5233		
$X_3 * X_4$	281	1	281	1.0155	0.3525	-8.26	-0.1809	0.8587	4160	1	4160	5.1768	0.0370	-1.61	-2.2753	0.0370		
Résiduel	19844	16	2095						12858	16	804							
Totale	65258	30							43873	30								

Données brutes pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alkaline des boues mixtes (BEM).
Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température ($^{\circ}$ Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

Code	Entomotoxicité (UI/ μ l)			Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)			Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)			Sporulation (%)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ⁹ UFC)
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle		
TAMK1	13490	12799	691	44	3,5	45,7	39	41,5	-2,5	88,6	0,035
TAMK2	13772	13360	412	44	3,5	50,9	42	48,6	-6,6	95,5	0,033
TAMK3	14160	14232	-73	34	2,7	45,9	33	41,8	-8,8	97,1	0,043
TAMK4	15498	15681	-183	41	3,3	42,5	35	41,6	-6,6	85,4	0,044
TAMK5	11800	11900	-101	53	4,2	55,9	41	45,4	-4,4	77,4	0,029
TAMK6	12416	11944	472	50	4,0	53,0	41	44,8	-3,8	82,0	0,030
TAMK7	13493	13127	367	49	3,9	56,0	40	48,0	-8,0	81,6	0,034
TAMK8	14142	14058	84	44	3,5	44,7	38	40,1	-2,1	86,4	0,037
TAMK9	12825	12996	-170	47	3,8	54,9	36	41,4	-5,4	76,6	0,036
TAMK10	11747	11876	-130	67	5,4	62,5	52	50,8	1,2	77,6	0,023
TAMK11	13737	13972	-235	53	4,2	52,5	40	43,0	-3,0	75,5	0,034
TAMK12	13755	13740	14	46	3,7	51,7	42	45,1	-3,1	91,3	0,033
TAMK13	16351	15931	420	56	4,5	57,0	47	47,1	-0,1	83,9	0,035
TAMK14	14281	14295	-14	60	4,8	56,7	50	48,8	1,2	83,3	0,029
TAMK15	16203	16701	-498	53	4,2	54,7	50	50,9	-0,9	94,3	0,032
TAMK16	15498	15952	-454	45	3,6	45,9	41	45,3	-4,3	91,1	0,038
TAME1	13273	14032	-759	63	5,0	50,7	58	43,8	14,2	92,1	0,023
TAME2	16731	16122	609	60	4,8	61,1	49	49,0	0,0	81,7	0,034
TAME3	11023	11738	-715	57	4,6	54,7	46	43,0	3,0	80,7	0,024
TAME4	15392	14828	564	53	4,2	44,1	51	39,8	11,2	96,2	0,030
TAME5	14459	14584	-125	58	4,6	46,8	55	45,6	9,4	94,8	0,026
TAME6	14371	14397	-26	43	3,4	43,1	52	47,1	4,9	120,9	0,028
TAME7	12046	12134	-88	65	5,2	55,2	55	44,8	10,2	84,6	0,022
TAME8	13385	13447	-62	61	4,9	59,6	53	49,0	4,0	86,9	0,025
TAMC1	14811	14723	88	54	4,3	60,4	51	53,9	-2,9	94,4	0,029
TAMC2	14723	14723	0	63	5,0	60,4	47	53,9	-6,9	74,6	0,031
TAMC3	15163	14723	440	51	4,1	60,4	58	53,9	4,1	113,7	0,026
TAMC4	13719	14723	-1004	62	5,0	60,4	60	53,9	6,1	96,8	0,023
TAMC5	14089	14723	-634	61	4,9	60,4	50	53,9	-3,9	82,0	0,028
TAMC6	15058	14723	335	70	5,6	60,4	60	53,9	6,1	85,7	0,025
TAMC7	15498	14723	775	62	5,0	60,4	51	53,9	-2,9	82,3	0,030

Données complètes de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM vis-à-vis l'entomotoxicité. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse. $R^2 = 0,90$.

Composantes	SE	d.l.	ME	F	p	
Constant						
X_1	6552478	1	6552478	17.7109	0.0007	
X_1^2	224403	1	224403	0.6065	0.4475	
X_2	14323331	1	14323331	38.7150	<0.0001	
X_2^2	3706988	1	3706988	10.0197	0.0060	
X_3	52800	1	52800	0.1427	0.7106	
X_3^2	96769	1	96769	0.2616	0.6160	
X_4	2585234	1	2585234	6.9877	0.0177	
X_4^2	6673376	1	6673376	18.0377	0.0006	
$X_1 * X_2$	208475	1	208475	0.5635	0.4638	
$X_1 * X_3$	2822991	1	2822991	7.6303	0.0139	
$X_1 * X_4$	14703620	1	14703620	39.7429	<0.0001	
$X_2 * X_3$	787940	1	787940	2.1297	0.1638	
$X_2 * X_4$	42670	1	42670	0.1153	0.7386	
$X_3 * X_4$	267431	1	267431	0.7228	0.4078	
Source de variabilité	Modèle de régression	52617958	14	3758426	10,1588	<0,0001
	Résiduelle	5919502	16	369969		
	Manque d'ajustement	3595330	10	359533	0,9282	0,5640
	Erreur pure	2324172	6	387362		
	Totale	58537461	30			

Analyse de la variance (ANOVA) et de la régression des résultats du modèle mathématique pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BEM vis-à-vis les comptes totaux et le nombre de spores produites. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse.

Effets	Comptes totaux									Spores viables								
	ANOVA, $R^2 = 0,52$					Coefficients régression (β)				ANOVA, $R^2 = 0,38$					Coefficients régression (β)			
	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p		
Constant						-1424,83	-2,6173	0,0187						-973,75	-1,7916	0,0921		
X_1	160,17	1	160,17	2,3627	0,1438	4,38	0,5215	0,6092	40,04	1	40,04	0,5926	0,4526	3,03	0,3621	0,7220		
X_1^2	36,38	1	36,38	0,5367	0,4744	-0,05	-0,7326	0,4744	100,05	1	100,05	1,4808	0,2413	-0,07	-1,2169	0,2413		
X_2	170,67	1	170,67	2,5176	0,1321	86,52	1,9216	0,0727	15,04	1	15,04	0,2226	0,6434	83,12	1,8491	0,0830		
X_2^2	216,72	1	216,72	3,1970	0,0927	-2,75	-1,7880	0,0927	278,46	1	278,46	4,1211	0,0593	-3,12	-2,0300	0,0593		
X_3	20,17	1	20,17	0,2975	0,5930	13,05	2,5949	0,0195	3,38	1	3,38	0,0499	0,8260	7,28	1,4485	0,1668		
X_3^2	430,04	1	430,04	6,3438	0,0228	-0,04	-2,5187	0,0228	100,05	1	100,05	1,4808	0,2413	-0,02	-1,2169	0,2413		
X_4	28,17	1	28,17	0,4155	0,5283	4,76	1,2091	0,2442	26,04	1	26,04	0,3854	0,5435	3,00	0,7621	0,4571		
X_4^2	16,21	1	16,21	0,2392	0,6314	-0,01	-0,4890	0,6314	87,13	1	87,13	1,2895	0,2729	-0,02	-1,1355	0,2729		
$X_1 * X_2$	6,25	1	6,25	0,0922	0,7653	-0,12	-0,3036	0,7653	1,56	1	1,56	0,0231	0,8810	0,06	0,1521	0,8810		
$X_1 * X_3$	6,25	1	6,25	0,0922	0,7653	0,01	0,3036	0,7653	5,06	1	5,06	0,0749	0,7878	0,01	0,2737	0,7878		
$X_1 * X_4$	64,00	1	64,00	0,9441	0,3457	-0,04	-0,9716	0,3457	3,06	1	3,06	0,0453	0,8341	0,01	0,2129	0,8341		
$X_2 * X_3$	72,25	1	72,25	1,0658	0,3172	-0,21	-1,0324	0,3172	52,56	1	52,56	0,7779	0,3908	-0,18	-0,8820	0,3908		
$X_2 * X_4$	0,00	1	0,00	0,0000	1,0000	0,00	0,0000	1,0000	5,06	1	5,06	0,0749	0,7878	0,06	0,2737	0,7878		
$X_3 * X_4$	64,00	1	64,00	0,9441	0,3457	-0,02	-0,9716	0,3457	60,06	1	60,06	0,8889	0,3598	-0,02	-0,9428	0,3598		
Résiduel	1081,11	16	67,57						1084,64	16	67,79							
Totale	1734,84	30							2272,20	30								

Données brutes pour l'optimisation de l'hydrolyse thermo-alkaline des boues secondaires (BES).
Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

Code	Entomotoxicité (UI/ μ l)			Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)			Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)			Sporulation (%)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle		
TASK1	15058	14268	790	68,0	81,2	-13,2	54,0	58,9	-4,9	79,4	0,028
TASK2	13719	12949	771	80,0	63,9	16,1	66,0	56,2	9,8	82,5	0,021
TASK3	15181	13502	1679	93,0	97,4	-4,4	77,0	72,2	4,8	82,8	0,020
TASK4	14389	13494	895	88,0	77,0	11,0	65,0	69,8	-4,8	73,9	0,022
TASK5	14477	14431	46	149,0	118,9	30,1	129,0	111,5	17,5	86,6	0,011
TASK6	16731	14780	1951	113,0	102,5	10,5	94,0	91,6	2,4	83,2	0,018
TASK7	14172	12646	1526	119,0	156,0	-37,0	106,0	131,6	-25,6	89,1	0,013
TASK8	14054	14306	-252	155,0	136,7	18,3	142,0	111,9	30,1	91,6	0,010
TASK9	16062	13248	2814	168,0	159,9	8,1	30,0	48,4	-18,4	17,9	0,054
TASK10	11377	11693	-316	178,0	135,5	42,5	51,0	42,9	8,1	28,7	0,022
TASK11	12046	12786	-740	97,0	102,0	-5,0	19,0	38,9	-19,9	19,6	0,063
TASK12	15058	12542	2516	71,0	74,7	-3,7	28,0	33,7	-5,7	39,4	0,054
TASK13	13708	13392	316	127,0	132,5	-5,5	36,0	48,8	-12,8	28,3	0,038
TASK14	14389	13505	883	140,0	109,2	30,8	33,0	26,0	7,0	23,6	0,044
TASK15	13702	11911	1791	106,0	95,7	10,3	48,0	46,0	2,0	45,3	0,029
TASK16	13755	13334	420	88,0	69,4	18,6	11,0	23,6	-12,6	12,5	0,125
TASE1	13050	14866	-1816	118,0	117,8	0,2	116,0	133,5	-17,5	98,3	0,011
TASE2	10919	12875	-1956	97,0	129,1	-32,1	58,0	34,7	23,3	59,8	0,019
TASE3	10373	12114	-1741	78,0	121,8	-43,8	49,0	56,2	-7,2	62,8	0,021
TASE4	9146	11178	-2031	110,0	98,1	11,9	80,0	67,0	13,0	72,7	0,011
TASE5	13050	15274	-2224	183,0	158,8	24,2	113,0	87,2	25,8	61,7	0,012
TASE6	13831	15379	-1548	59,0	115,1	-56,1	42,0	62,0	-20,0	71,2	0,033
TASE7	9557	11875	-2318	32,0	41,7	-9,7	24,0	11,4	12,6	75,0	0,040
TASE8	11377	12831	-1454	52,0	74,1	-22,1	47,0	53,9	-6,9	90,4	0,024
TASC1	13966	11949	2017	71,0	65,4	5,6	55,0	44,9	10,1	77,5	0,025
TASC2	12140	11949	191	81,0	65,4	15,6	48,0	44,9	3,1	59,3	0,025
TASC3	12269	11949	320	91,0	65,4	25,6	65,0	44,9	20,1	71,4	0,019
TASC4	10819	11949	-1130	61,0	65,4	-4,4	37,0	44,9	-7,9	60,7	0,029
TASC5	9909	11949	-2040	43,0	65,4	-22,4	25,0	44,9	-19,9	58,1	0,040
TASC6	12827	11949	878	67,0	65,4	1,6	54,0	44,9	9,1	80,6	0,024
TASC7	11712	11949	-237	44,0	65,4	-21,4	30,0	44,9	-14,9	68,2	0,039

Données complètes de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BES vis-à-vis l'entomotoxicité. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001, 0.01$ ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse. $R^2 = 0,37$.

Composantes	SE	d.l.	ME	F	p
Constant					
X_1	5947168	1	5947168	1,3636	0,2600
X_1^2	6601098	1	6601098	1,5135	0,2364
X_2	1315175	1	1315175	0,3016	0,5905
X_2^2	164165	1	164165	0,0376	0,8486
X_3	16366	1	16366	0,0038	0,9519
X_3^2	20390561	1	20390561	4,6753	0,0461
X_4	1371331	1	1371331	0,3144	0,5827
X_4^2	292167	1	292167	0,0670	0,7991
$X_1 * X_2$	92191	1	92191	0,0211	0,8862
$X_1 * X_3$	55760	1	55760	0,0128	0,9114
$X_1 * X_4$	370	1	370	0,0001	0,9928
$X_2 * X_3$	1717732	1	1717732	0,3939	0,5391
$X_2 * X_4$	1040468	1	1040468	0,2386	0,6319
$X_3 * X_4$	2783324	1	2783324	0,6382	0,4361
Modèle de régression	40350859	14	2882204	0,6608	0,7792
Résiduelle	69782028	16	4361377		
Manque d'ajustement	59311532	10	5931153	3,3988	0,0738
Erreur pure	10470496	6	1745083		
Totale	110132887	30			

Analyse de la variance (ANOVA) et de la régression des résultats du modèle mathématique pour l'hydrolyse thermo-alkaline des BES vis-à-vis les comptes totaux et le nombre de spores produites. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse.

Effets	Comptes totaux									Spores viables						
	ANOVA, $R^2 = 0,67$					Coefficients régression (β)				ANOVA, $R^2 = 0,8$					Coefficients régression (β)	
	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p
Constant						3797,17	1,8189	0,0877						1716,71	1,2533	0,2281
X_1	193	1	193	0,1933	0,6661	11,62	0,3613	0,7226	14652	1	14652	34,1435	0,0000	-11,29	-0,5349	0,6001
X_1^2	6010	1	6010	6,0286	0,0259	0,58	2,4553	0,0259	2756	1	2756	6,4219	0,0221	0,39	2,5342	0,0221
X_2	840	1	840	0,8428	0,3722	-104,11	-0,6030	0,5550	176	1	176	0,4102	0,5309	-47,26	-0,4171	0,6821
X_2^2	3537	1	3537	3,5483	0,0779	11,12	1,8837	0,0779	503	1	503	1,1710	0,2952	4,19	1,0821	0,2952
X_3	2860	1	2860	2,8691	0,1097	-49,23	-2,5520	0,0213	950	1	950	2,2139	0,1562	-19,75	-1,5607	0,1382
X_3^2	9134	1	9134	9,1623	0,0080	0,18	3,0269	0,0080	1584	1	1584	3,6905	0,0727	0,07	1,9211	0,0727
X_4	1568	1	1568	1,5731	0,2278	7,71	0,5107	0,6165	2709	1	2709	6,3136	0,0231	16,39	1,6548	0,1174
X_4^2	101	1	101	0,1012	0,7545	-0,02	-0,3181	0,7545	267	1	267	0,6232	0,4414	-0,03	-0,7894	0,4414
$X_1 * X_2$	5476	1	5476	5,4931	0,0323	-3,70	-2,3437	0,0323	518	1	518	1,2061	0,2884	-1,14	-1,0982	0,2884
$X_1 * X_3$	49	1	49	0,0492	0,8273	-0,03	-0,2217	0,8273	8	1	8	0,0176	0,8960	-0,01	-0,1328	0,8960
$X_1 * X_4$	4225	1	4225	4,2382	0,0562	-0,32	-2,0587	0,0562	2730	1	2730	6,3618	0,0226	-0,26	-2,5223	0,0226
$X_2 * X_3$	9	1	9	0,0090	0,9255	-0,07	-0,0950	0,9255	0	1	0	0,0001	0,9905	0,01	0,0121	0,9905
$X_2 * X_4$	441	1	441	0,4424	0,5155	0,53	0,6651	0,5155	46	1	46	0,1062	0,7488	0,17	0,3258	0,7488
$X_3 * X_4$	1	1	1	0,0010	0,9751	0,00	0,0317	0,9751	298	1	298	0,6934	0,4173	-0,04	-0,8327	0,4173
Résiduel	15950	16	997						6866	16	429					
Totale	48161	30							33797	30						

Données brutes pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des boues mixtes (BEM).
Variables indépendantes : X_1 = MES (g/l) ; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température (°Celsius) de l'hydrolyse; X_4 = durée (min) de l'hydrolyse.

Code	Entomotoxicité (UI/ μ l)			Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)			Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)			Sporulation (%)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle		
TOMK1	10875	11932	-1057	34,0	47,1	-13,1	30,0	42,2	-12,2	88,2	0,036
TOMK2	10987	12598	-1611	39,0	29,5	9,5	39,0	27,3	11,7	100,0	0,028
TOMK3	13050	13569	-519	52,0	69,6	-17,6	39,0	58,4	-19,4	75,0	0,033
TOMK4	14976	13798	1178	54,0	52,5	1,5	28,0	34,7	-6,7	51,9	0,053
TOMK5	10931	12617	-1686	44,0	57,8	-13,8	27,0	38,9	-11,9	61,4	0,040
TOMK6	13003	12921	82	48,0	49,1	-1,1	20,0	33,7	-13,7	41,7	0,065
TOMK7	12604	11394	1210	30,0	40,3	-10,3	27,0	34,4	-7,4	90,0	0,047
TOMK8	10839	11262	-423	28,0	32,1	-4,1	17,0	20,4	-3,4	60,7	0,064
TOMK9	14180	13328	852	45,0	42,6	2,4	35,0	31,1	3,9	77,8	0,041
TOMK10	13422	13883	-461	16,0	11,5	4,5	11,0	10,9	0,1	68,8	0,122
TOMK11	14265	13598	667	57,0	61,6	-4,6	49,0	42,5	6,5	86,0	0,029
TOMK12	15832	13717	2115	43,0	31,0	12,0	26,0	13,6	12,4	60,5	0,061
TOMK13	15222	15651	-429	49,0	56,3	-7,3	37,0	37,5	-0,5	75,5	0,041
TOMK14	16793	15844	949	50,0	34,1	15,9	47,0	27,1	19,9	94,0	0,036
TOMK15	15102	13061	2041	24,0	35,3	-11,3	17,0	28,3	-11,3	70,8	0,089
TOMK16	14624	12818	1806	21,0	13,6	7,4	14,0	9,0	5,0	66,7	0,104
TOME1	14198	12196	2002	102,0	81,3	20,7	92,0	63,9	28,1	90,2	0,015
TOME2	11968	15149	-3181	45,0	58,3	-13,3	20,0	41,4	-21,4	44,4	0,060
TOME3	17453	15184	2269	18,0	20,2	-2,2	17,0	19,0	-2,0	94,4	0,103
TOME4	10347	13795	-3448	32,0	22,2	9,8	26,0	17,2	8,8	81,3	0,040
TOME5	11935	11886	49	114,0	79,9	34,1	82,0	59,2	22,8	71,9	0,015
TOME6	11081	12309	-1228	14,0	40,6	-26,6	9,0	25,0	-16,0	64,3	0,123
TOME7	12853	12846	7	17,0	18,1	-1,1	12,0	13,5	-1,5	70,6	0,107
TOME8	11447	12632	-1185	20,0	11,4	8,6	14,0	5,7	8,3	70,0	0,082
TOMC1	12381	12662	-281	31,0	26,6	4,4	24,0	16,1	7,9	77,4	0,052
TOMC2	10931	12662	-1731	29,0	26,6	2,4	11,0	16,1	-5,1	37,9	0,099
TOMC3	13311	12662	649	24,0	26,6	-2,6	16,0	16,1	-0,1	66,7	0,083
TOMC4	14736	12662	2074	17,0	26,6	-9,6	10,0	16,1	-6,1	58,8	0,147
TOMC5	11788	12662	-874	22,0	26,6	-4,6	14,0	16,1	-2,1	63,6	0,084
TOMC6	13050	12662	388	27,0	26,6	0,4	15,0	16,1	-1,1	55,6	0,087
TOMC7	12433	12662	-229	36,0	26,6	9,4	23,0	16,1	6,9	63,9	0,054

Données complètes de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour le traitement thermo-oxydant des BEM vis-à-vis l'entomotoxicité. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001, 0.01$ ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse. $R^2 = 0,36$.

Composantes	SE	d.l.	ME	F	p	
Constant						
X_1	13078311	1	13078311	3,1199	0,0964	
X_1^2	1825506	1	1825506	0,4355	0,5187	
X_2	2893290	1	2893290	0,6902	0,4183	
X_2^2	5969908	1	5969908	1,4242	0,2501	
X_3	268374	1	268374	0,0640	0,8035	
X_3^2	569217	1	569217	0,1358	0,7173	
X_4	68488	1	68488	0,0163	0,8999	
X_4^2	10776	1	10776	0,0026	0,9602	
$X_1 * X_2$	1868038	1	1868038	0,4456	0,5139	
$X_1 * X_3$	12266	1	12266	0,0029	0,9575	
$X_1 * X_4$	2682628	1	2682628	0,6400	0,4354	
$X_2 * X_3$	190558	1	190558	0,0455	0,8339	
$X_2 * X_4$	8179213	1	8179213	1,9512	0,1815	
$X_3 * X_4$	130639	1	130639	0,0312	0,8621	
Source de variabilité	Modèle de régression	37852345	14	2703739	0,6450	0,7923
	Résiduelle	67069483	16	4191843		
	Manque d'ajustement	58302900	10	5830290	3,9904	0,0520
	Erreur pure	8766582	6	1461097		
	Totale	104921828	30			

Analyse de la variance (ANOVA) et de la régression des résultats du modèle mathématique pour le traitement thermo-oxydant des BEM vis-à-vis les comptes totaux et le nombre de spores produites. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse.

Effets	Comptes totaux								Spores viables							
	ANOVA, $R^2 = 0,71$					Coefficients régression (β)			ANOVA, $R^2 = 0,62$					Coefficients régression (β)		
	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p
Constant						1659,79	1,5046	0,1519						1420,42	1,3227	0,2045
X_1	793,50	1	793,50	2,8507	0,1107	-20,63	-1,2132	0,2427	759,38	1	759,38	2,8787	0,1091	-22,08	-1,3338	0,2009
X_1^2	3332,10	1	3332,10	11,9708	0,0032	0,43	3,4599	0,0032	2378,71	1	2378,71	9,0175	0,0084	0,36	3,0029	0,0084
X_2	6,00	1	6,00	0,0216	0,8851	61,48	0,6739	0,5100	5,04	1	5,04	0,0191	0,8918	44,13	0,4969	0,6260
X_2^2	50,61	1	50,61	0,1818	0,6755	-1,33	-0,4264	0,6755	7,02	1	7,02	0,0266	0,8724	0,50	0,1632	0,8724
X_3	2320,67	1	2320,67	8,3372	0,0107	-23,00	-2,2558	0,0384	1751,04	1	1751,04	6,6381	0,0203	-16,67	-1,6795	0,1125
X_3^2	2027,16	1	2027,16	7,2827	0,0158	0,08	2,6987	0,0158	1206,51	1	1206,51	4,5738	0,0482	0,06	2,1386	0,0482
X_4	66,67	1	66,67	0,2395	0,6312	7,93	0,9942	0,3349	92,04	1	92,04	0,3489	0,5630	0,85	0,1095	0,9141
X_4^2	249,76	1	249,76	0,8973	0,3576	-0,03	-0,9472	0,3576	75,93	1	75,93	0,2878	0,5990	-0,02	-0,5365	0,5990
$X_1 * X_2$	12,25	1	12,25	0,0440	0,8365	-0,17	-0,2098	0,8365	22,56	1	22,56	0,0855	0,7737	-0,24	-0,2925	0,7737
$X_1 * X_3$	182,25	1	182,25	0,6547	0,4303	-0,07	-0,8092	0,4303	27,56	1	27,56	0,1045	0,7507	-0,03	-0,3232	0,7507
$X_1 * X_4$	9,00	1	9,00	0,0323	0,8596	0,02	0,1798	0,8596	95,06	1	95,06	0,3604	0,5567	0,05	0,6003	0,5567
$X_2 * X_3$	0,25	1	0,25	0,0009	0,9765	0,01	0,0300	0,9765	76,56	1	76,56	0,2902	0,5975	-0,22	-0,5387	0,5975
$X_2 * X_4$	1600,00	1	1600,00	5,7481	0,0291	-1,00	-2,3975	0,0291	430,56	1	430,56	1,6322	0,2196	-0,52	-1,2776	0,2196
$X_3 * X_4$	81,00	1	81,00	0,2910	0,5970	0,02	0,5394	0,5970	95,06	1	95,06	0,3604	0,5567	0,02	0,6003	0,5567
Résiduel	4453,63	16	278,35						4220,61	16	263,79					
Totale	15283,48	30							11139,10	30						

**Données brutes pour l'optimisation du traitement thermo-oxydant des boues secondaires (BES).
Variables indépendantes : X₁ = MES (g/l) ; X₂ = pH de l'hydrolyse; X₃ = température (°Celsius) de l'hydrolyse; X₄ = durée (min) de l'hydrolyse.**

Code	Entomotoxicité (UI/μl)			Comptes totaux (UFCx10 ⁷ /ml)			Spores viables (UFCx10 ⁷ /ml)			Sporulation (%)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur résiduelle		
TOSK1	12626	10190	2437	23,0	38,2	-15,2	10,0	24,0	-14,0	43,5	0,126
TOSK2	11937	11925	13	25,0	24,5	0,5	25,0	16,5	8,5	100,0	0,048
TOSK3	15820	14629	1191	27,0	31,2	-4,2	24,0	22,8	1,2	88,9	0,066
TOSK4	14681	15214	-533	26,0	18,7	7,3	19,0	12,8	6,2	73,1	0,077
TOSK5	13542	15074	-1532	19,0	27,8	-8,8	10,0	10,0	0,0	52,6	0,135
TOSK6	16564	15333	1230	29,0	38,4	-9,4	18,0	26,5	-8,5	62,1	0,092
TOSK7	15859	15184	675	24,0	25,5	-1,5	17,0	15,3	1,7	70,8	0,093
TOSK8	14093	14294	-200	25,0	37,3	-12,3	15,0	29,3	-14,3	60,0	0,094
TOSK9	12302	11856	446	65,0	55,7	9,3	64,0	45,5	18,5	98,5	0,019
TOSK10	13418	14136	-718	29,0	35,7	-6,7	20,0	27,5	-7,5	69,0	0,067
TOSK11	12630	13904	-1273	46,0	44,9	1,1	44,0	41,3	2,7	95,7	0,029
TOSK12	16811	15034	1777	32,0	26,2	5,8	25,0	20,8	4,2	78,1	0,067
TOSK13	14250	13760	490	23,0	38,5	-15,5	15,0	27,0	-12,0	65,2	0,095
TOSK14	13620	14564	-945	44,0	42,8	1,2	36,0	33,0	3,0	81,8	0,038
TOSK15	11712	11478	233	29,0	32,5	-3,5	25,0	29,3	-4,3	86,2	0,047
TOSK16	8653	11133	-2480	45,0	38,0	7,0	41,0	32,8	8,2	91,1	0,021
TOSE1	14612	16151	-1539	35,0	18,8	16,2	22,0	13,2	8,8	62,9	0,066
TOSE2	15992	14656	1336	32,0	37,0	-5,0	31,0	38,2	-7,2	96,9	0,052
TOSE3	11600	12209	-609	60,0	43,3	16,7	29,0	23,9	5,1	48,3	0,040
TOSE4	13624	13217	407	26,0	31,5	-5,5	19,0	22,6	-3,6	73,1	0,072
TOSE5	10849	12081	-1232	52,0	38,5	13,5	32,0	29,7	2,3	61,5	0,034
TOSE6	14500	13470	1030	28,0	30,3	-2,3	25,0	25,7	-0,7	89,3	0,058
TOSE7	11475	13043	-1568	34,0	38,6	-4,6	17,0	27,8	-10,8	50,0	0,068
TOSE8	15392	14026	1366	56,0	40,1	15,9	38,0	25,8	12,2	67,9	0,041
TOSC1	14167	14095	72	47,0	40,6	6,4	36,0	27,3	8,7	76,6	0,039
TOSC2	11816	14095	-2280	63,0	40,6	22,4	46,0	27,3	18,7	73,0	0,026
TOSC3	13422	14095	-673	29,0	40,6	-11,6	28,0	27,3	0,7	96,6	0,048
TOSC4	16389	14095	2294	57,0	40,6	16,4	26,0	27,3	-1,3	45,6	0,063
TOSC5	13303	14095	-792	29,0	40,6	-11,6	19,0	27,3	-8,3	65,5	0,070
TOSC6	15293	14095	1198	24,0	40,6	-16,6	14,0	27,3	-13,3	58,3	0,109
TOSC7	14277	14095	182	35,0	40,6	-5,6	22,0	27,3	-5,3	62,9	0,065

Données complètes de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour le traitement thermo-oxydant des BES vis-à-vis l'entomotoxicité. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001, 0.01$ ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse. $R^2 = 0,54$.

Composantes		SE	d.l.	ME	F	p
Constant						
	X_1	3350578	1	3350578	1,0846	0,3132
	X_1^2	3057452	1	3057452	0,9897	0,3346
	X_2	1524548	1	1524548	0,4935	0,4925
	X_2^2	3413548	1	3413548	1,1049	0,3088
	X_3	2896832	1	2896832	0,9377	0,3473
	X_3^2	3112528	1	3112528	1,0075	0,3304
	X_4	1450873	1	1450873	0,4696	0,5030
	X_4^2	561590	1	561590	0,1818	0,6755
	$X_1 * X_2$	5721197	1	5721197	1,8519	0,1924
	$X_1 * X_3$	296813	1	296813	0,0961	0,7606
	$X_1 * X_4$	8880506	1	8880506	2,8746	0,1094
	$X_2 * X_3$	1322659	1	1322659	0,4281	0,5222
	$X_2 * X_4$	18742162	1	18742162	6,0667	0,0255
	$X_3 * X_4$	2176781	1	2176781	0,7046	0,4136
Source de variabilité	Modèle de régression	57099808	14	4078558	1,3202	0,2945
	Résiduelle	49429478	16	3089342		
	Manque d'ajustement	36418003	10	3641800	1,6793	0,2715
	Erreur pure	13011476	6	2168579		
	Totale	106529286	30			

Analyse de la variance (ANOVA) et de la régression des résultats du modèle mathématique pour le traitement thermo-oxydant des BES vis-à-vis les comptes totaux et le nombre de spores produites. Caractères gras = résultat significatif à $p < 0.001$, 0.01 ou 0.05 . Effet des variables indépendantes : X_1 = MES des boues; X_2 = pH de l'hydrolyse; X_3 = température de l'hydrolyse; X_4 = durée de l'hydrolyse.

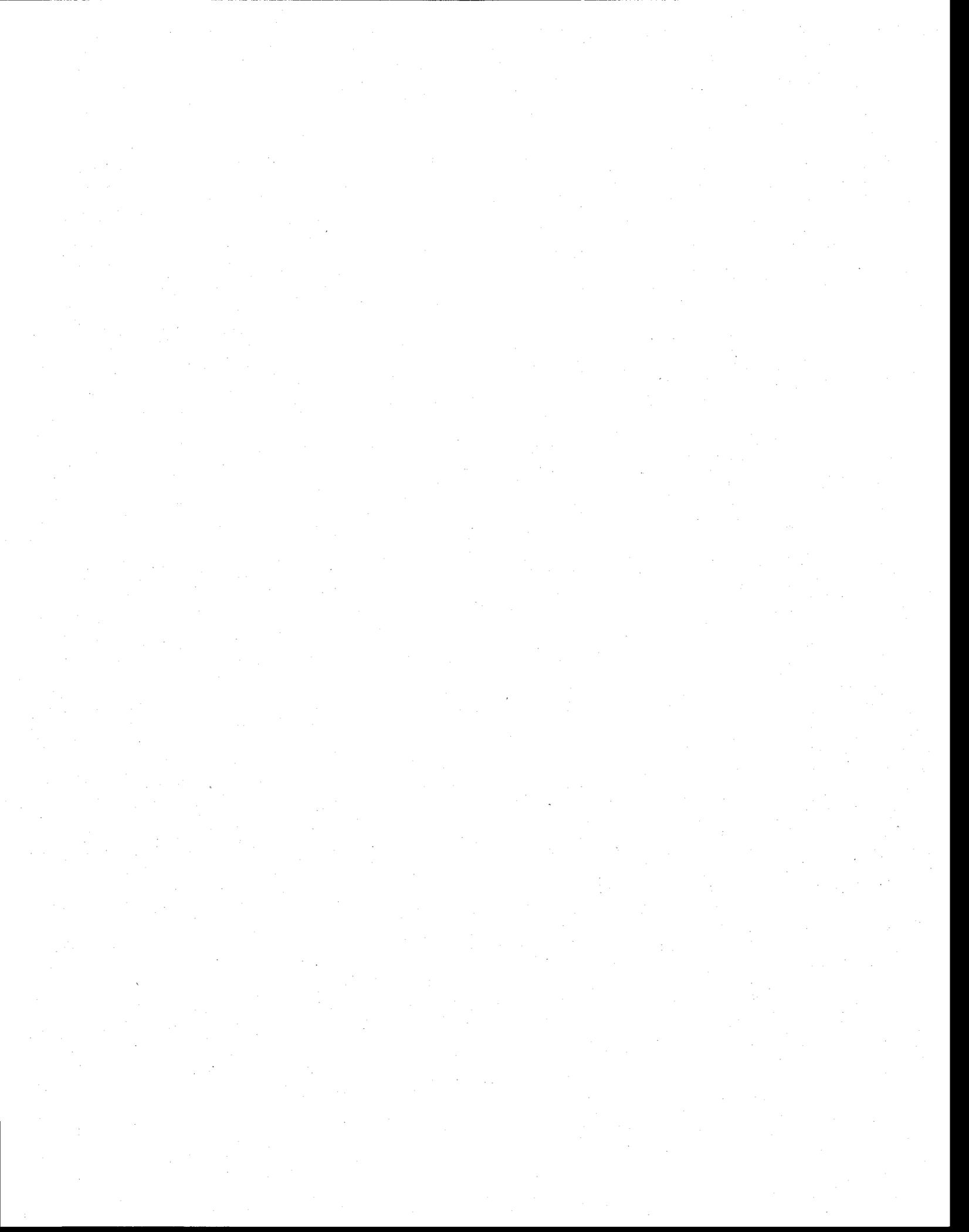
Effets	Comptes totaux						Spores viables									
	ANOVA, $R^2 = 0,34$					Coefficients régression (β)			ANOVA, $R^2 = 0,43$					Coefficients régression (β)		
	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p	SE	d.l.	ME	F	p	Valeur	t	p
Constant						-396,13	-0,4028	0,6924						-215,92	-0,2672	0,7927
X_1	495,04	1	495,04	2,2378	0,1541	17,06	1,1255	0,2770	937,50	1	937,50	6,2774	0,0234	11,85	0,9516	0,3555
X_1^2	288,10	1	288,10	1,3023	0,2706	-0,13	-1,1412	0,2706	4,22	1	4,22	0,0282	0,8687	-0,02	-0,1680	0,8687
X_2	210,04	1	210,04	0,9495	0,3444	11,65	0,1432	0,8879	2,67	1	2,67	0,0179	0,8954	28,97	0,4335	0,6704
X_2^2	18,26	1	18,26	0,0825	0,7776	-0,80	-0,2873	0,7776	29,11	1	29,11	0,1949	0,6648	-1,01	-0,4415	0,6648
X_3	100,04	1	100,04	0,4522	0,5109	3,10	0,3407	0,7378	24,00	1	24,00	0,1607	0,6938	0,24	0,0318	0,9750
X_3^2	68,62	1	68,62	0,3102	0,5853	-0,02	-0,5570	0,5853	0,39	1	0,39	0,0026	0,9601	0,00	0,0508	0,9601
X_4	3,38	1	3,38	0,0153	0,9032	-8,28	-1,1638	0,2616	6,00	1	6,00	0,0402	0,8437	-9,21	-1,5757	0,1347
X_4^2	2,56	1	2,56	0,0116	0,9157	0,00	-0,1075	0,9157	0,51	1	0,51	0,0034	0,9540	0,00	-0,0586	0,9540
$X_1 * X_2$	14,06	1	14,06	0,0636	0,8042	-0,19	-0,2521	0,8042	9,00	1	9,00	0,0603	0,8092	-0,15	-0,2455	0,8092
$X_1 * X_3$	39,06	1	39,06	0,1766	0,6799	-0,03	-0,4202	0,6799	110,25	1	110,25	0,7382	0,4029	-0,05	-0,8592	0,4029
$X_1 * X_4$	45,56	1	45,56	0,2060	0,6560	-0,03	-0,4538	0,6560	20,25	1	20,25	0,1356	0,7175	-0,02	-0,3682	0,7175
$X_2 * X_3$	1,56	1	1,56	0,0071	0,9341	0,03	0,0840	0,9341	6,25	1	6,25	0,0418	0,8405	-0,06	-0,2046	0,8405
$X_2 * X_4$	22,56	1	22,56	0,1020	0,7536	0,12	0,3194	0,7536	42,25	1	42,25	0,2829	0,6021	0,16	0,5319	0,6021
$X_3 * X_4$	588,06	1	588,06	2,6583	0,1225	0,06	1,6304	0,1225	576,00	1	576,00	3,8569	0,0672	0,06	1,9639	0,0672
Résiduel	3539,46	16	221,22						2389,512	16	149,34					
Totale	5393,87	30							4156,839	30						

Contrôles négatifs effectués lors des travaux d'optimisation en fioles Erlenmeyer. Boues stériles contenant 25 g MES/l et non fermentées par Btk HD-1.

Boue	% mortalité après 7 jours ^a
BEM4	12 ^b
BEM5	0
BES4	4
BES5	4
BES6	8

^a Pourcentage de mortalité chez 25 individus (larves de *C. occidentalis*) après 7 jours avec un échantillon de boues stériles non dilués.

^b Bien que le pourcentage de mortalité était légèrement supérieur à celui du témoin (8%) lors du bioessai, le bioessai a été considéré comme valide.



ANNEXE 9
Données des expériences en fermenteur



Données brutes de l'expérience contrôle sur le milieu semi-synthétique à base de soja en bioréacteur. Fermentation par Btk HD-1. Volume de travail = 10 litres. Taux de croissance (μ) = 0,51 h⁻¹.

T (h)	Comptes totaux (UFC / ml)	Cellules viables (UFC / ml)	Spores viables (UFC / ml)	Sporul. (%)	Entomotox. (UI/μl)	Act. proteo. (UI/ml)	Contenu en prot. (mg/ml)	k _L a (h ⁻¹)
0	2,10E+06	2,10E+06	7,00E+02	0,0				149,4
3	4,80E+07	4,80E+07	6,95E+02	0,0				51,5
6	9,60E+07	9,60E+07	4,50E+02	0,0				114,0
9	4,80E+08	4,80E+08	3,20E+03	0,0				200,8
12	7,10E+08	6,74E+08	3,62E+07	5,1				283,9
15	8,90E+08	7,87E+08	1,03E+08	11,6				85,4
18	6,15E+08	7,00E+07	5,45E+08	88,6				77,5
24	8,70E+08	6,00E+07	8,10E+08	93,1				36,5
30	6,97E+08	2,47E+08	4,50E+08	64,6				84,7
36	9,25E+08	1,00E+08	8,25E+08	89,2				64,6
48	6,60E+08	0,00E+00	6,60E+08	100,0	6470	3,02	5,10	166,5

Données brutes de l'expérience contrôle sur les boues secondaires (BES) en bioréacteur. Fermentation par Btk HD-1. [MES] = 25 g/l. Volume de travail = 10 litres. Taux de croissance (μ) = 0,23 h⁻¹.

T (h)	Comptes totaux (UFC/ml)	Cellules viables (UFC/ml)	Spores viables (UFC/ml)	Sporul. (%)	Entomotox. (UI/μl)	Act. proteo. (UI/ml)	Contenu en prot. (mg/ml)	k _L a (h ⁻¹)	Taille particules (μm)			Visco. (cP)
									D10	D50	D90	
0	1,30E+07	1,30E+07	4,30E+03	0,0				141,3	6,26	24,3	70,2	57
3	3,80E+07	3,80E+07	7,00E+03	0,0				122,5	3,59	18,1	38,5	50
6	1,73E+08	1,73E+08	7,00E+05	0,0				23,2	2,74	19	47,4	39
9	2,30E+08	2,05E+08	2,47E+07	0,0				35,4	1,37	11,6	39,7	33
12	3,17E+08	2,57E+08	6,00E+07	5,1				33,5	1,49	10,1	47,5	37,7
15	5,98E+08	4,88E+08	1,10E+08	11,6				49,9	1,05	6,4	27,1	24
18	5,40E+08	2,90E+08	2,50E+08	88,6				46,0	0,84	4,96	24,9	20
21	6,60E+08	3,90E+08	2,70E+08	93,1				84,9	0,87	5,1	25,7	21
24	5,95E+08	2,75E+08	3,20E+08	64,6				17,8	0,72	6,96	30,7	20
30	5,20E+08	1,90E+08	3,30E+08	89,2	12827	0,714		92,2	0,74	6,99	40,3	18
36	5,40E+08	2,05E+08	3,35E+08	100,0	12158	1,341		63,5	0,75	5,27	30,8	13
48	5,00E+08	2,00E+08	3,00E+08	0,0	12715	0,948	0,82	37,3	0,5	1,7	4,9	24

Données brutes de l'expérience sur l'hydrolyse alcaline des boues secondaires (ALS) en bioréacteur. Fermentation par Btk HD-1. Paramètres de l'hydrolyse des BES : [MES] = 37,2 g/l ; pH = 10,2 ; température = 27,6°C ; durée = 33,5 h. Volume de travail = 10 litres. Taux de croissance (μ) = 0,25 h⁻¹.

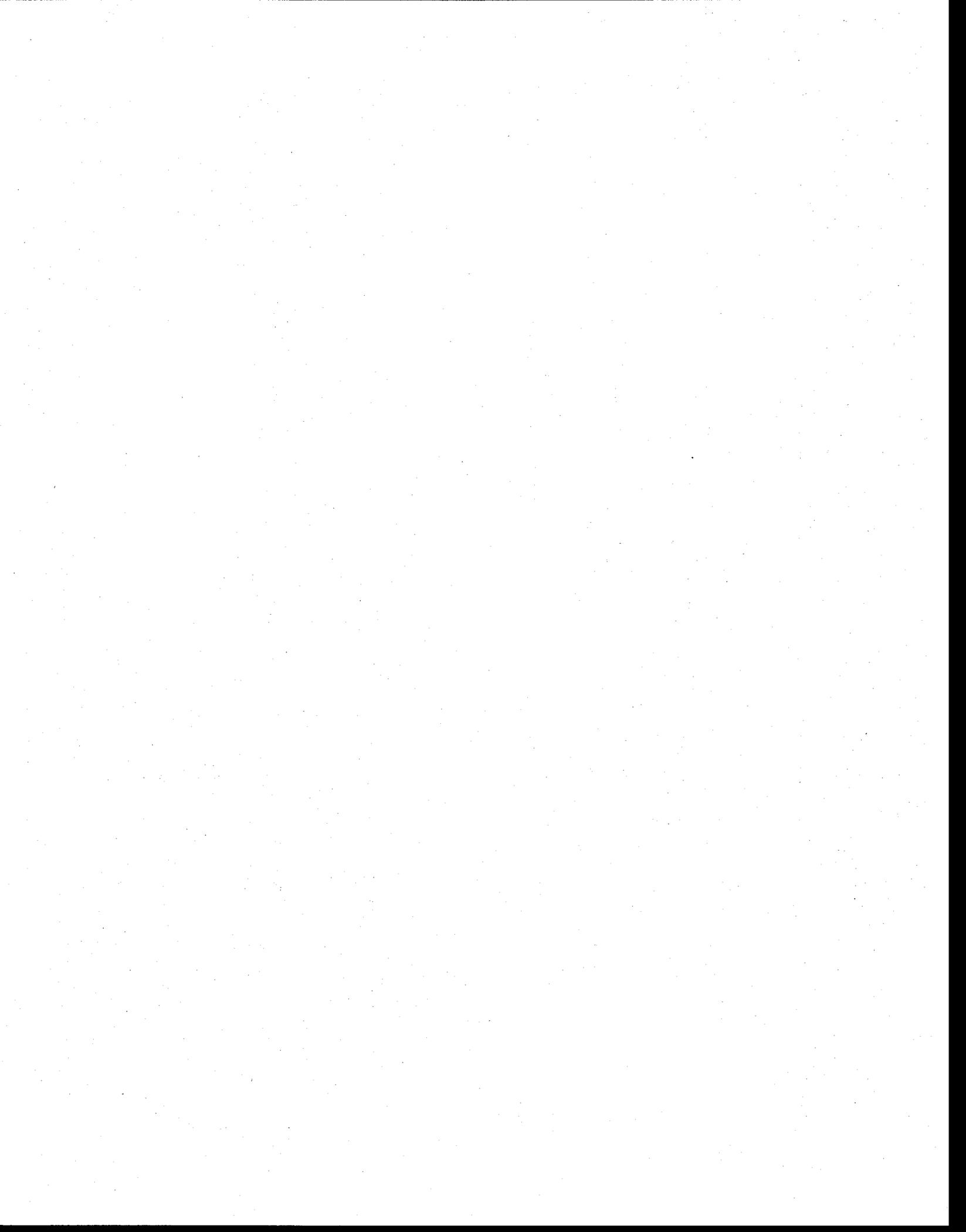
T (h)	Comptes totaux (UFC/ml)	Cellules viables (UFC/ml)	Spores viables (UFC/ml)	Sporul. (%)	Entomotox. (UI/ μ l)	Act. proteo. (UI/ml)	Contenu en prot. (mg/ml)	k _L a (h ⁻¹)	Taille particules (μ m)			Visco. (cP)
									D10	D50	D90	
0	7,33E+06	7,33E+06	1,33E+03	0,0				162,9	2,06	22,03	81,78	7,96
3	1,43E+07	1,43E+07	2,00E+03	0,0				131,8	1,9	20,56	71,99	7,43
6	4,00E+07	3,96E+07	4,33E+05	1,1				29,5	1,8	18,62	59,19	8,06
9	1,17E+08	7,43E+07	4,23E+07	36,3				70,3	1,67	17,03	52,9	8,35
12	2,17E+08	1,45E+08	7,20E+07	33,2				71,7	1,43	14,49	46,86	8,16
15	4,60E+08	3,63E+08	9,70E+07	21,1				42,2	1,25	12,37	43,49	8,03
18	5,37E+08	4,07E+08	1,30E+08	24,2				46,1	1,11	9,49	42,8	11,5
21	3,17E+08	9,67E+07	2,20E+08	69,5				48,9	1,05	7,38	36,35	12
24	2,90E+08	5,67E+07	2,33E+08	80,5				24,0	1,04	7,05	33,54	12,67
30	3,40E+08	6,00E+07	2,80E+08	82,4	14500	0,293		20,8	1,23	8,6	10,73	10,73
36	3,77E+08	5,67E+07	3,20E+08	85,0	14735	0,664		15,4	0,81	6,21	10,17	10,17
48	5,10E+08	6,67E+07	4,43E+08	86,9	17424	0,715	0,79	34,8	0,59	5,42	9,37	9,37

Données brutes de l'expérience sur l'hydrolyse thermo-alcaline des boues secondaires (TAS) en bioréacteur. Fermentation par Btk HD-1. Paramètres de l'hydrolyse des BES : [MES] = 37,4 g/l ; pH = 10,5 ; température = 141,3°C ; durée = 21,3 min. Volume de travail = 10 litres. Taux de croissance (μ) = 0,43 h⁻¹.

T (h)	Comptes totaux (UFC/ml)	Cellules viables (UFC/ml)	Spores viables (UFC/ml)	Sporul. (%)	Entomotox. (UI/ μ l)	Act. proteo. (UI/ml)	Contenu en prot. (mg/ml)	k _L a (h ⁻¹)	Taille particules (μ m)			Visco. (cP)
									D10	D50	D90	
0	7,50E+06	7,50E+06	3,33E+03	0,0				38,1	1,48	13,18	39,45	3,74
3	3,00E+07	3,00E+07	9,33E+03	0,0				38,5	1,25	10,79	35,18	3,59
6	1,93E+08	1,90E+08	3,20E+06	1,7				36,3	1,13	10,83	43,74	3,6
9	3,40E+08	2,80E+08	6,00E+07	17,6				24,2	1,18	7,27	36,91	5,71
12	4,37E+08	3,03E+08	1,33E+08	30,5				54,0	1,25	6,64	28,75	7,85
15	4,00E+08	1,05E+08	2,95E+08	73,8				36,3	1,29	6,74	27,03	6,94
18	4,60E+08	1,60E+08	3,00E+08	65,2				92,9	1,24	6,1	28,77	6,21
21	3,43E+08	1,67E+07	3,27E+08	95,1				26,7	1,1	6,05	30,87	6,15
24	4,37E+08	8,67E+07	3,50E+08	80,2				99,3	0,83	4,99	29,28	5,39
30	4,33E+08	7,33E+07	3,60E+08	83,1	15169	0,495		11,9	0,67	4,66	27,11	4,81
36	2,90E+08	1,00E+07	2,80E+08	96,6	18181	0,687		249,2	0,71	5,09	33,67	3,61
48	3,97E+08	3,33E+06	3,93E+08	99,2	18962	0,524	0,80	133,1	0,6	3,98	30,6	4,09

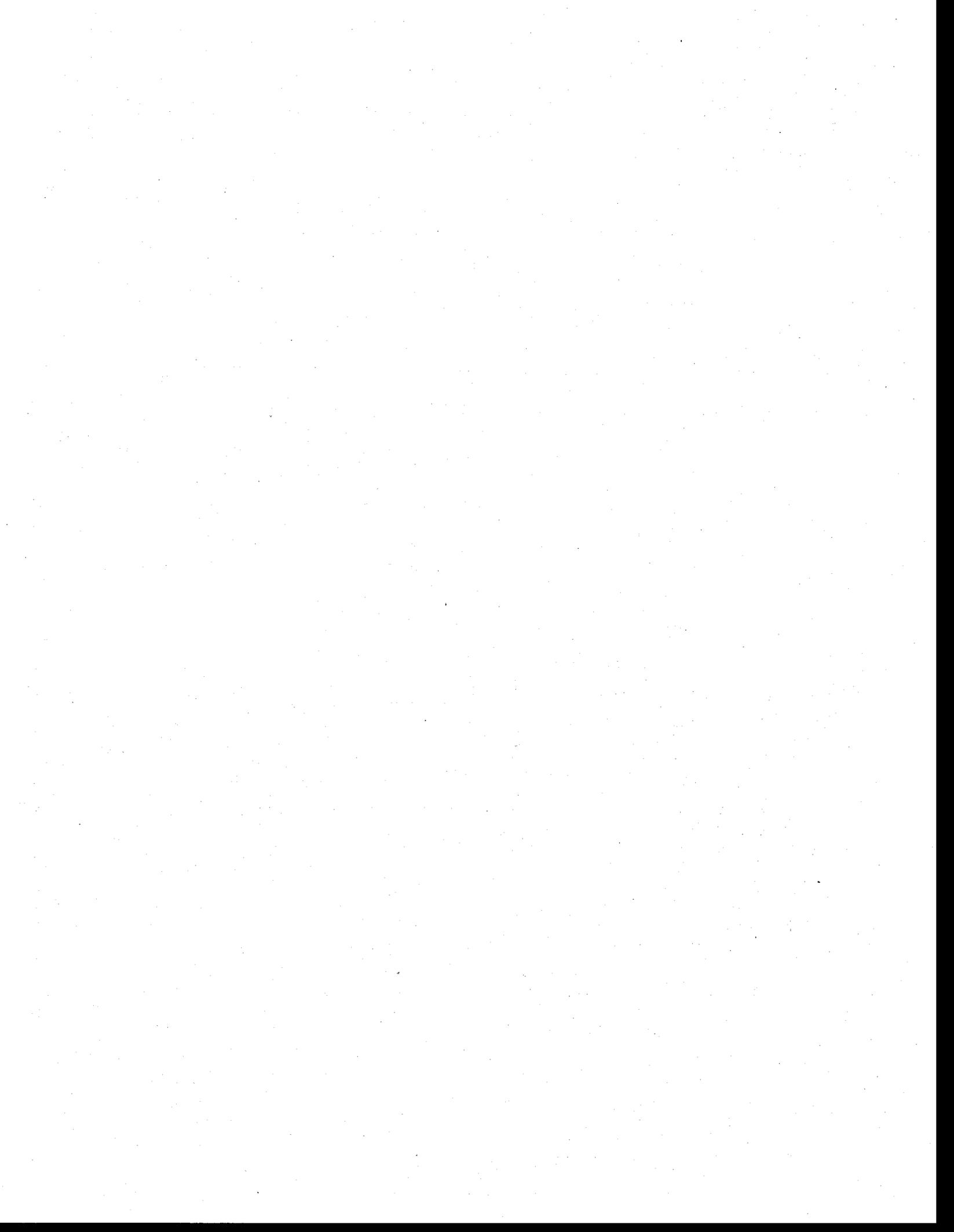
Données brutes de l'expérience sur le **traitement thermo-oxydant des boues secondaires (TOS)** en bioréacteur. Fermentation par Btk HD-1. Paramètres du traitement des BES : [MES] = 36,4 g/l ; pH = 9,8 ; température = 146,6°C ; durée = 30,3 min. Volume de travail = 10 litres. Taux de croissance (μ) = 0,69 h⁻¹.

T (h)	Comptes totaux (UFC/ml)	Cellules viables (UFC/ml)	Spores viables (UFC/ml)	Sporul. (%)	Entomotox. (UI/ μ l)	Act. proteo. (UI/ml)	Contenu en prot. (mg/ml)	k _{t,a} (h ⁻¹)	Taille particules (μ m)			Visco. (cP)
									D10	D50	D90	
0	5,00E+06	5,00E+06	5,00E+03	0,1				15,4	2,17	9,01	27,9	3,65
3	2,10E+07	2,09E+07	8,80E+04	0,4				34,8	1,84	7,38	18,6	3,51
6	2,57E+08	2,56E+08	1,00E+06	0,4				24,0	1,58	6,79	31	5,05
9	2,60E+08	2,18E+08	4,23E+07	16,3				20,8	1,33	5,81	29,8	6,61
12	3,87E+08	2,37E+08	1,50E+08	38,8				71,7	1,12	5,16	28,1	5,79
15	4,60E+08	1,90E+08	2,70E+08	58,7				42,2	1,18	4,8	20,9	4,78
18	5,57E+08	1,57E+08	4,00E+08	71,9				34,3	0,91	4,51	29,9	4,41
21	4,27E+08	1,17E+08	3,10E+08	72,7				48,9	0,86	4,48	33	5,2
24	4,30E+08	1,20E+08	3,10E+08	72,1				29,5	0,81	4,61	30	7,92
30	4,13E+08	8,33E+07	3,30E+08	79,8	16842	1,437		70,3	0,8	4,32	30,6	9,51
36	4,80E+08	1,30E+08	3,50E+08	72,9	16285	1,333		230,0	0,66	3,61	24,7	5,43
48	4,90E+08	1,70E+08	3,20E+08	65,3	17846	1,241	0,62	162,9	0,63	3,26	27,9	3,57



ANNEXE 10

**Données des expériences sur
l'entomotoxicité de diverses suspensions
de Btk HD-1, des spores et des cristaux
purifiés**



Données brutes sur diverses suspensions de bouillons fermentés par Btk HD-1. Mélange des deux bouillons fermentés obtenus lors des expériences de validation des conditions optimales des traitements en Erlenmeyer. SOJA = milieu soja ; BEM = Boues mixtes ; TAM = Boues mixtes traitées (hydrolyse thermo-alcaline) ; BES = Boues secondaires ; TAS = Boues secondaires traitées (hydrolyse thermo-alcaline).

SURNAGEANT

Milieu	Entomotoxicité (UI/ul)		Spores résiduelles (UFC/ml)	Contenu en protéines solubles (mg/ml)	Ratio Tx/prot.soluble (UI/mg prot. soluble)
	Valeur	Diff. p/r soja (%)			
SOJA	4325		3,20E+04	4,430	0,976
BEM	2459	-43	8,90E+04	0,452	5,44
TAM	4277	-1	3,00E+05	0,909	4,71
BES	6785	57	3,30E+04	1,032	6,58
TAS	7174	66	6,80E+04	0,860	8,34

CULOT

Milieu	Entomotoxicité (UI/ul)		Spores viables (UFC/ml)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)	Contenu en protéines solubles totales (mg/ml)	Ratio Tx/prot.soluble (UI/mg prot. soluble)
	Valeur	Diff. p/r soja (%)				
SOJA	12420		2,45E+09	0,005	0,314	39,6
BEM	15417	24	3,50E+09	0,004	0,268	57,6
TAM	11211	-10	6,10E+09	0,002	0,269	41,6
BES	16726	35	2,00E+09	0,008	0,301	55,6
TAS	15184	22	6,10E+09	0,002	0,323	47,0

SPORES PURIFIÉES

Milieu	Entomotoxicité (UI/ul)		Nombre de spores viables (UFC/ml)	Ratio Tx/spores (UI/1x10 ³ UFC)	Contenu en protéines solubles totales résiduelles (mg/ml)
	Valeur	Diff. p/r soja (%)			
SOJA	734		1,00E+07	0,073	0,054
BEM	1957	167	1,00E+07	0,196	0,002
BES	978	33	1,00E+07	0,098	0,071

CRISTAUX PURIFIÉS

Milieu	Entomotoxicité (UI/ul)		Spores résiduelles (UFC/ml)	Contenu en protéines solubles totales (mg/ml)	Ratio Tx/prot.soluble (UI/mg prot. soluble)
	Valeur	Diff. p/r soja (%)			
SOJA	761		4,45E+04	0,100	7,61
BEM	1984	161	4,00E+05	0,100	19,0
BES	2732	259	8,00E+04	0,100	27,3

Contrôles négatifs effectués sur les boues stériles utilisées pour les expériences de validation en fioles Erlenmeyer et pour l'obtention du surnageant et du culot. Boues traitées ou non traitées, et non fermentées par Btk HD-1.

Boue	Pré-traitement	Type de suspension	% mortalité après 7 jours ^a
BEM6	Aucun	Complète	0
		Surnageant	8
		Culot	12 ^b
	Hydrolyse thermo-alkaline	Complète	4
		Surnageant	0
		Culot	0
BES7	Aucun	Complète	12 ^b
		Surnageant	4
		Culot	4
	Hydrolyse thermo-alkaline	Complète	8
		Surnageant	12 ^b
		Culot	8

^a Pourcentage de mortalité chez 25 individus (larves de *C. occidentalis*) après 7 jours avec un échantillon non dilué.

^b Le pourcentage de mortalité était légèrement supérieur à celui du témoin (de 0 à 8% selon les bioessais). Comme la mortalité était inférieure à 10% avec le témoin, le bioessai a été considéré comme valide.

**Les boues d'épuration,
aujourd'hui, ce sont des matières résiduelles...**

Demain, ce seront des matières premières.