

**CONCEPTION D'UNE DIÈTE POUR L'ÉLEVAGE DE *CYDIA POMONELLA* EN
UTILISANT LES EAUX USÉES DES INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES
COMME SUBSTITUTS DE CERTAINS AGENTS NUTRITIFS**

Par

JEAN ROBERT GNEPE

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Prof. James T. Agbejavie, Département de génie chimie U.Q.T.R. Dr. Harnaivo Rasamimanana, Directeur de recherche à BioTEPP Inc.
Examineur interne	Prof. Patrick Drogui, (INRS-ETE)
Directeur de recherche	Prof. Tyagi Rajeshwar Dayal (INRS-ETE)
Codirecteurs de recherche	Prof. Satinder Kaur Brar (INRS-ETE) Dr. José Valéro, Chercheur invité (INRS-ETE)

RÉSUMÉ

Le carpocapse de pomme (CP), *Cydia pomonella* (L) est le principal ravageur des pommes et des autres vergers dans les régions tempérées. Les méthodes traditionnelles de contrôle contre ces insectes sont dominées par les insecticides chimiques qui ont un impact néfaste sur la santé et l'environnement. Face à cela, le contrôle biologique par le virus granuleux (*Baculovirus*) s'est avéré le plus efficace contre le CP, sans affecter les organismes bénéfiques et la biodiversité. Ce bioinsecticide est produit en infectant, par des *granulovirus*, des larves du CP élevées sur des diètes spécifiques et commerciales. Cependant, le coût de production de la diète est très élevé à cause du prix des composants synthétiques et semi-synthétiques qui entrent dans sa composition. Cela, limite la production de ce *Baculovirus*. Face à ce problème, les boues municipales et les eaux usées d'industries agroalimentaires (industrie d'amidon, industrie de jus de pomme et micro-brasserie) peuvent être utilisées comme agents nutritifs alternatifs à certains ingrédients actifs (Farine de soja, germe de blé et extrait de levure) de la diète standard afin de réduire son coût de production. Les résultats de la caractérisation de ces différents rejets ont permis de sélectionner et de choisir les boues d'industries de pommes (POM) (45 ± 11 g/L ST; 22.0 ± 0.03 g/L glucides; 11.3 ± 1.3 g/L protéines; 2 ± 0.2 lipides) et les eaux usées de micro-brasserie (EMB) (65 ± 15 g/L ST; 25.5 ± 5.5 g/L glucides; 16.9 ± 2.1 g/L protéines; 6 ± 1.6 g/L lipides) comme les rejets qui ont fourni le potentiel nutritif le plus élevé et dont la teneur en métaux lourds ne présente aucun risque (car très faible) pour les larves élevées sur les diètes produites. Néanmoins, le potentiel nutritif et la rhéologie des rejets ont été améliorés par des prétraitements d'hydrolyse et de lyophilisation, afin de résoudre le problème de la viscosité et des tailles des particules rencontrées au sein des diètes produites à partir des rejets. Le remplacement des ingrédients standards par les rejets choisis s'est effectué sur la base de la masse sèche de la concentration des nutriments (protéines, glucides, lipides et minéraux) apportés dans les diètes produites sans modifier leur quantité et surtout sans affecter la texture, la structure et la rhéologie de la diète.

Pour obtenir une meilleure diète pouvant rentabiliser l'élevage de *C. pomonella* dans les conditions standards de l'industrie (25 °C, 50 % et 16h:8), l'optimisation de la production de la diète à partir des rejets (EMB et POM) hydrolysés ou non, et des ingrédients remplaçables (farine de soja, germe de blé et extrait de levure) a été réalisée par la méthodologie de la réponse en surface (MRS) et le logiciel STATISTICA ANOVA. Les résultats obtenus ont montré que les diètes EMBH+FS et POMH+FS avec les rejets hydrolysés (à pH initial, 30 min et à 100

°C) ont fourni les meilleurs résultats en élevage de carpocapse (93% d'éclosion des œufs, 80% de survie des larves et obtention de 53% d'adultes pour la diète EMBH+FS; et 80% d'éclosion, 70% larves et 35% d'adultes pour la diète POM+FS) par rapport à la diète contrôle (90% d'éclosion, 80% larves et 44% d'adultes). Ces résultats sont excellents vis-à-vis du bilan de masse nutritive obtenu sur EMBH+FS (4 mg glucide, 3 mg protéine et 1,1 mg lipide assimilés) et sur POMH+FS (3 mg glucide, 2 mg protéine et 0,8 mg lipide assimilés); et surtout à cause de la rhéologie des diètes EMBH+FS (397 mPa.s et 87 µm) et POMH+FS (235 mPa.s et 156 µm) qui a été beaucoup réduite par rapport à la diète contrôle (105 mPa.s et 186 µm) pour rentabiliser l'élevage du carpocapse de pomme.

En définitive, la substitution de un ou plusieurs ingrédients (farine de soja, germe de blé et extrait de levure) de la diète standard, par les rejets agro-industriels (EMB et POM) disponibles en tout temps, économiques et riches en nutriments, peut réduire le coût de la diète et contribuer à valoriser de façon utile et économique les rejets agroindustriels (les boues et les eaux usées). Ceci peut réduire aussi le coût de production du granulovirus sur le marché, améliorer la lutte biologique contre le carpocapse de pomme et limiter l'utilisation des insecticides chimiques.

ABSTRACT

The codling moth (CM), *Cydia pomonella* (L.1758), is a principal pest of the orchards in the temperate regions. The traditional pest control methods have been mostly dominated by the chemical insecticides which resulted in adverse impacts on environment and health. At this juncture, biological control using baculovirus proves to be the most optimal method against the CM larvae, without affecting other beneficial organisms and biodiversity. This bioinsecticide is produced by infecting granulovirus, a natural entomopathogen of CM larvae which is cultivated on a commercial diet. However, the production cost of the diet is higher due to the use of synthetic and semi-synthetic ingredients which make up its constitution. This limits the baculovirus production on an economical scale. In order to confront this problem, agro-industrial wastes (starch industry wastewater-SIW, brewery wastewater-BWW and apple pomace sludge - POM) and municipal waste (wastewater sludge-WWS) can be used as alternative nutrients agents of certain active components (soya flour, wheat germ and yeast extract) of standard diet to reduce its production cost. The results showed that POM (45 ± 11 g/L ST; 22.0 ± 0.03 g / L carbohydrates; 11.3 ± 1.3 g/L proteins; 2 ± 0.2 lipids) and BWW (65 ± 15 g/L ST; 25.5 ± 5.5 g/L carbohydrates; 16.9 ± 2.1 g/L proteins; 6 ± 1.6 g/L lipids) possessed higher nutrient content (C, N, proteins, carbohydrates and lipids) were lower in toxic elements (metals and gas), viscosity and particle size as compared to SIW and WWS. In order to further increase the nutritional potential and improve the rheological ability of these wastes, pre-treatment was effectuated by hydrolysis and freeze-drying. The pre-treatment reduced the viscosity and particles size of alternative diets. The replacement of standard components by wastes based on dry mass of the concentration of nutrients (proteins, carbohydrates, lipids and minerals) resulted in excellent diet without affecting the taste, the structure and the rheology of the diet. The hydrolysis pre-treatment process for effective breeding of *C. pomonella* larvae was tested on diets optimized (BWWH+SF and POMH+SF) by the response surface methodology using STATISTICA ANOVA software. The industry standard conditions used for larval breeding were 25 °C, 50 % and 16h:8. The obtained results showed that the diet BWWH+SF (93 % hatching, 80 % larvae and 53 % adults) and POMH+FS (80 % hatching, 70 % larvae and 35 % adults) with the hydrolyzed wastes (in pH initial, 30 min and in 100 °C) supplied the best results breeding of codling moth larvae compared to control diet (90 % hatching, 80 % larvae and 44 % adults). These results demonstrate the nutrient mass balance obtained for BWWH+SF (4 mg carbohydrate, 3 mg protein and 1.1 mg lipids) and POMH+SF (3 mg carbohydrate, 2 mg protein and 0.8 mg lipids);

and especially due to improved rheology of BWWH+SF diets (397 mPa.s and 87 μ m) and POMH+SF (235 mPa.s and 156 μ m) as compared to control diet (105 mPa.s and 186 μ m) to make breeding of the codling moth profitable. Later, the replacement of one or several ingredients (soya flour, wheat germ and yeast extract) of standard diet, by the agro-industrial wastes (BWW and POM) which are economical and rich in nutrients, can reduce the cost of the diet. This can lead to possible decreased cost of production of the granulovirus and improve the biological control against the codling moth by limiting the use of chemical insecticides.

AVANT-PROPOS

PUBLICATIONS / MANUSCRITS DANS CETTE THÈSE

1. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2011) Agro-industrial waste as ingredient replacement for codling moth diet. *Nova Science Publishers, Inc., chapitre 3854. Manuscrit accepté.*
2. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2011) Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides. *Journal of Environmental Science and Health Part B (2011) 46, 1–12.*
3. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2011) Statistical optimization of agro-industrial diets for rearing of *Cydia pomonella* by Response Surface Methodology. *Agronomy Research journal, 9 (1-2), 281-297.*
4. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2012) Pre-treatment of agro-industrial waste used as alternative nutrients for rearing *Cydia pomonella*. *Biosystems Engineering, doi:10.1016/j.biosystemseng.2011.12.002*
5. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2011) Activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella* élevées sur des diètes à base des rejets agroindustriels hydrolysés. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. Manuscrit soumis.*
6. **Revue: Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., (2011) Diets for breeding of codling moth larvae: conventional and alternative approach. *Nova Science Publishers, Inc., chapitre 3849. Manuscrit accepté.*

CONGRÈS ET CONFÉRENCES

1. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R. (2011) Bilan nutritif et activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella* élevées sur les diètes à base des rejets agro-industriels hydrolysés. *27st Congress of the East Canada Research on the Water Quality, CAWQ, ACQE, Friday, October 7, 2011 at Québec, Québec, Canada.*
2. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2009) Diètes produites à partir des eaux usées agro-industrielles pour l'élevage de *Cydia pomonella* – bilan nutritionnelle. *25st Congress of the East Canada Research on the Water Quality, CAWQ, ACQE, Friday, November 4, 2009 at Ottawa, Ontario, Canada.*
3. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2008) Faisabilité des déchets pour la production de la diète d'insecte (*Cydia pomonella*). *24st Eastern Canadian Symposium on Water quality Research –Montreal, Nov 3rd, 2008, Montréal, Canada.*
4. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2008) Production d'une diète pour l'élevage de *Cydia pomonella* à partir des ressources naturelles (eaux usées et boues d'épuration). *IWA World Water Congress and Exhibition. 7–12 September 2008, Sherbrook, Canada.*
5. **Gnepe J.R.**, Brar S.K., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2007) *Proceedings of IWA specialist conference moving forward wastewater biosolids sustainability: technical, managerial, and public synergy. June 24-27, 2007 Moncton, New Brunswick, Canada, pp 1101-1108.*

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont l'encontre de mon directeur de thèse, le Professeur Rajeshwar D. Tyagi, de mes co-directeurs, le Dr. Satinder K. Brar et du Dr. José R. Valéro, pour m'avoir accepté dans leur équipe de recherche, pour leurs suivis et leurs conseils durant l'élaboration et l'aboutissement final de mon projet de doctorat.

Je remercie les autres membres du jury, le Professeur Agbegbavi James T., le président du jury, le Dr. Harnaivo Rasamimanana et le Dr. Patrick Drogui d'avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse. Leurs remarques avisées m'ont permis de mieux orienter mon projet de doctorat. Mes sincères remerciements vont également au Dr. Satinder K. Brar qui n'a ménagé aucun effort pour me soutenir dans cette quête du savoir.

Je ne saurais terminer sans adresser mes remerciements les plus chaleureux au Directeur Mr. Yves Bégin, aux personnels de l'INRS et en particuliers aux techniciens du laboratoire (Michelle, Sébastien, Pauline et Stéphane Prémont) dont le concours a été très déterminant dans la réalisation de ce projet.

Enfin, je remercie tous mes amis de l'INRS, en particulier mes collègues de laboratoire (Kokou, Khan, Thung...) qui m'ont apporté une aide précieuse durant toute cette période d'étude.

À ma mère et à mon oncle Fanin Adama qui m'ont soutenu durant tout mon parcours scolaire. À mon père qui nous a quitté en Février 2008, que cette thèse te comble de joie depuis là haut.

À ma patrie la Côte d'Ivoire, que la bannière de l'éternel Dieu soit pour toi un manteau protecteur indestructible.

Que Dieu vous bénisse

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT	v
AVANT-PROPOS	vii
REMERCIEMENTS	ix
TABLE DES MATIÈRES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES	xxiii

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Chapitre I SYNTHÈSE.....	5
--------------------------	---

Partie 1 Revue de littérature	7
1.1 Le Carpocapse de pomme	7
1.1.1 Définition, structure et biologie.....	7
1.1.2 Distribution géographique	9
1.1.3 Symptômes et dégâts.....	11
1.1.4 Moyens de lutte.....	12
1.2 Baculovirus	15
1.2.1 Définition et structure.....	15
1.2.2 Cycle d'infection et production commerciale du Baculovirus	16
1.3 Diète d'insectes.....	19
1.3.1 Définition et Historique	19
1.3.2 Diètes standards ou conventionnelles	20
1.3.3 Diètes alternatives ou non conventionnelles	20
1.3.4 Les composants nutritifs des diètes d'insectes	21
1.4 Prétraitement des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration.....	29
1.4.1 Hydrolyse.....	29
1.4.2 Lyophilisation.....	35
1.4.3 Modification des caractères physiques des boues	35
1.5 Paramètres d'élevage des insectes	37
1.6 Activité enzymatique chez les insectes	39
1.6.1 Protéases	41

1.6.2 Amylases	41
1.6.3 Lipases.....	41
 Partie 2 PROBLÉMATIQUES	43
2.1 Production de la diète d'insecte à partir des eaux usées et des boues	43
2.1.1 Problématique du coût de production de la Diète	43
2.1.2 Disposition et traitement des eaux usées agroindustrielles et des boues afin d'augmenter la solubilisation des nutriments et l'assimilation des diètes	44
2.1.3 Évaluation de l'activité enzymatique des larves du carpocapse de pomme élevées sur les diètes relativement à la teneur des nutriments assimilés	45
 Partie 3 HYPOTHÈSES – OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	47
3.1 Hypothèse de recherche	47
3.1.1 Justification des hypothèses.....	47
3.2 Objectifs et méthodologies	49
3.2.1 Objectif général.....	49
3.2.2 Objectifs spécifiques	49
3.3 Plan expérimental	51
3.3.1 Schéma du plan expérimental de cette thèse	51
3.3.2 Démarche méthodologique.....	52
 Partie 4 RESULTATS ET DISCUSSION	55
4.1 Conception de la diète alternative.....	57
4.1.1 Sélection et caractérisation des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration	57
4.1.2 Influence des diètes alternatives sur la croissance de <i>Cydia pomonella</i>	58
4.1.3 Bilan de masse des nutriments assimilés par les larves durant leur élevage	58
4.1.4 Étude des propriétés physiques des diètes sur la croissance du CP	59
4.1.5 Optimisation de la diète produite avec les rejets de POM et d'EMB afin de rentabiliser la culture de <i>C. pomonella</i>	60

4.2 Prétraitement des rejets sélectionnés pour la production de la diète	63
4.2.1 Caractérisation du potentiel nutritif et des propriétés physiques des rejets hydrolysés	63
4.2.2 Effet du prétraitement sur les diètes et la croissance des larves du CP.....	64
4.3 Influence de l'activité enzymatique sur la digestion des aliments par les larves de C. pomonella	66
Bibliographie	67

CHAPITRE II Conception d'une diète économique à partir des eaux usées et des boues 79

PARTIE 1 AGRO-INDUSTRIAL WASTE AS INGREDIENT REPLACEMENT FOR CODLING MOTH DIET	81
RÉSUMÉ.....	83
ABSTRACT	85
Introduction	87
Materials and methods	89
Codling moth larvae	89
Culture media for rearing codling moth larvae	89
Pre-treatment and characterization of agro-industrial wastes	89
Diet preparation	90
Physical consistency of the diet	90
Mode of rearing	90
Techniques of evaluation of mass and nutrients of the diet assimilated by larvae	91
Physical and Chemical parameters.....	91
Biological parameters	93
Viability of eggs	93
Viability of larvae and adults	93
Mass and number of adults obtained / fertility rate	93
Statistical analysis.....	93
Results and discussion.....	95
Selection and characteristics of agro-industrial wastes.....	95
Selection of ingredients and mass of wastes	95
Physical consistency and pH of diets.....	96
Mass breakdown of nutrients assimilated by larvae	96
Mass balance study and effect of concentrations of nutrients consumed by larvae.....	97

Physical and chemical parameters	98
Biological parameters	98
Hatching rate of eggs and growth of larvae	98
Physiological mass of adults (male and female) after breeding	99
Conclusion	101
Acknowledgements	103
List of abbreviations	105
References.....	107

PARTIE 2 Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides	117
RÉSUMÉ.....	119
ABSTRACT	121
Introduction	123
Materials and methods	125
Codling moth larvae	125
Pre-treatment and characterization of agro-industrial wastes	125
Culture media for rearing codling moth larvae	126
Diets Rheology.....	127
Viscosity	127
Particle size analysis	128
Biological parameters	128
Statistical analyses	129
Results and discussion.....	131
Selection and characteristics of agro-industrial wastes.....	131
Rheological profiles.....	131
Shear-thinning behaviour	132
Rheological models	134
Change in particle size distribution	134
Viscosity and particle size effect of diets on larva growth	135
Conclusions	137
Acknowledgements	139
List of abbreviations	141
References.....	143

PARTIE 3 Statistical optimization of agro-industrial diets for rearing of <i>Cydia pomonella</i> by Reponse Surface Methodology.....	155
RÉSUMÉ.....	157
ABSTRACT	159
1. Introduction	161
2. Material and methods	163
2.1. Codling moth larvae	163
2.2. Culture media for rearing codling moth larvae	163
2.3. Viscosity	164
2.4. Experimental plan for optimization of diets used for rearing of codling moth	164
2.5. Physico-chemical parameters	165
2.6. Statistical analyses	166
3. Results and discussion	167
3.1. Characterization of apple pomace and microbrewery used for the production of diets for rearing of <i>Cydia pomonella</i>	167
3.2. Experimental plan for response surface methodology (RSM).....	167
3.3. Optimization of diets by response surface methodology (RSM).....	168
3.4. Analysis of optimization of experimental plan by RSM.....	169
3.5. Agar solution properties	170
4. Conclusion	173
Acknowledgments	175
List of abbreviations	177
References.....	179

CHAPITRE III Influence du prétraitement sur la croissance de <i>Cydia pomonella</i> cultivé sur les diètes à base des eaux usées	191
---	------------

PARTIE 1 PRE-TREATMENT OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE USED AS ALTERNATIVE NUTRIENTS FOR REARING <i>CYDIA POMONELLA</i>	193
RÉSUMÉ.....	195
ABSTRACT	197
ABBREVIATIONS	199
1. Introduction	201
2. Materials and methods	203
2.1 Codling moth.....	203
2.2 Sampling details	203

2.3 Pretreatment (hydrolysis and freeze-drying)	203
2.4 Physical-chemical parameters	204
2.5 Experimental plan of the pretreatment optimization	204
2.6 Culture media for rearing codling moth larvae	205
2.7 Statistical analyses	205
3. Results and discussion	207
3.1 Selection and characterization of agro-industrial wastes and municipal wastewater sludge (wws)	207
3.2 Hydrolysis influence on agro-industrial wastes biodegradability.....	207
3.3 Hydrolysis influence on nutrient potential of agro-industrial wastes.....	209
3.4 Influence on soluble metals concentration	210
3.5 Influence of diet on <i>Cydia pomonella</i> breeding	211
4. Conclusion	213
Acknowledgements	215
References.....	217

CHAPITRE IV Activité enzymatique des larves de <i>Cydia pomonella</i> élevées sur les diètes à base des rejets agro-industriels.....	227
--	-----

Partie I Activité enzymatique des larves de <i>Cydia pomonella</i> élevées sur des diètes à base des rejets agro-industriels hydrolysés.....	229
RÉSUMÉ.....	231
ABSTRACT	233
1. Introduction	235
2. Matériel et méthodes	237
2.1 Carpocapse de pomme	237
2.2 Milieux de culture utilisés pour l'élevage des larves du Carpocapse de pomme (CP).....	237
2.3 Les paramètres physico-chimiques.....	238
2.4 Bilan de masse des nutriments des diètes assimilées par les larves	238
2.5 Activité enzymatique des larves de <i>Cydia pomonella</i>	239
2.6 Analyse statistique	241
3. Résultats et discussion.....	243
3.1 Influence de l'hydrolyse sur le potentiel nutritif des boues agroindustrielles	243
3.2 Influence des diètes alternatives sur la croissance de <i>Cydia pomonella</i>	244
3.3 Bilan de masse nutritif des larves de <i>Cydia pomonella</i>	245

3.4 Activité enzymatique des larves de <i>Cydia pomonella</i>	246
4. Conclusion	249
Remerciements	251
Liste des abréviations	253
Références.....	255
 CHAPITRE V Conclusions et recommandations	265
 Conclusions	267
Caractérisation et sélection des rejets pour l'élevage du carpocapse de pomme (CP) ..	268
Propriétés physiques des diètes produites à base des EMB et de POM.....	269
L'optimisation des diètes à base des EMB et de POM et élevage de <i>Cydia pomonella</i> ...	269
Prétraitement d'hydrolyse des rejets utilisés pour la production des diètes servant à l'élevage du carpocapse de pomme (CP)	270
Activité enzymatique des larves du CP élevées sur les diètes à base d'EMB et de POM hydrolysée.....	270
Recommandations.....	273
 ANNEXES.....	275
Annexe I Données de l'article 1 du chapitre II : Agro-industrial waste as ingredient replacement for codling moth diet.....	277
Annexe II Données de l'article 2 du chapitre II : Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides	283
Annexe III Données de l'article 3 du chapitre II : Optimization of agro-industrial diets for rearing of <i>Cydia pomonella</i>	301
Annexe IV Données de l'article 1 du chapitre III : Prétraitement des rejets agroindustriels utilisés comme agents nutritifs alternatifs pour l'élevage de <i>Cydia pomonella</i>	305
Annexe V Notes.....	309
Composition, rôle et coût de chaque composant de la diète	309
1. Rôle de chaque composant de la diète standard de biotepp	311
2. Définitions	313
3. L'influence de la température sur les composants de la diète durant la cuisson.....	315
4. Rôle des nutriments pour les insectes	317
5. Rôle des nutriments dans la diète.....	319
6. Caractéristiques de la diète et conditions d'un bon élevage	321

7. Le coût des ingrédients de la diète standard	323
Annexe VI Notes.....	329
Présentation des sites et définitions des eaux usées et des boues d'épuration	329
1. Présentation des sites de prélèvements des échantillons	331
1.1 Eaux usées Agroindustrielles.....	331
1.2 Boues Secondaires de la Municipalité (BSM)	334
2. Définition des eaux usées et des boues d'épuration	335
3. Méthode de calcul statistique	337

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1.1:	Description, Biologie et cycle de développement du carpocapse de pomme	8
Tableau 1.2:	Classification classique du carpocapse de pomme	9
Tableau 1.3:	Les différentes lutttes contres les insectes ravageurs	12
Tableau 1.4:	Baculovirus utilisé comme insecticide biologique dans les vergers	17
Tableau 1.5:	Les composants standards d'une diète conventionnelle pour l'élevage des espèces de lépidoptère	27
Tableau 1.6:	Processus des prétraitements d'hydrolyse thermique	32
Tableau 1.7:	Traitements alcalin et thermo-alcalin des boues	34
Tableau 1.8:	Paramètres environnementaux nécessaires pour l'élevage du CP	37

CHAPITRE II

Table 2.1.1:	Physico-chemical characterization of different agro-industrial wastes	109
Table 2.1.2:	Mass of nutrients present in the quantity of wastes used to replace the ingredients of standard diet.	110
Table 2.1.3:	Numbers and mass of the adults of <i>Cydia pomonella</i>	111
Table 2.2.1:	Physico-chemical characterization of different agro-industrial wastes	145
Table 2.2.2:	Total solids concentration of different diets incorporating agro-industrial wastes	146
Table 2.2.3:	Rheological models of diets produced using agro-industrial wastes	147
Table 2.3.1:	Screening of various wastes	181
Table 2.3.2:	Codes and values of independent variables of different levels of 25 for central composite design (CCD) using response surface methodology (RSM)	182
Table 2.3.3:	Study of rearing parameters for diets produced using RSM	183
Table 2.3.4:	Observed, predicted and residual values of larval rearing resulting from CCD experiments	184
Table 2.3.5:	Design showing the sets of each run and corresponding nutrient and viscosity	185

Table 2.3.6:	Effect of estimation and regression coefficient of the components of model fitted to the data of CCD; $R^2 = 0.804$	186
--------------	---	-----

CHAPITRE III

Table 3.1:	Experimental conditions and codes associated to every preliminary experiment	219
Table 3.2:	Physico-chemical parameters	220
Table 3.3:	Study of the physical properties of the hydrolysis waste	221
Table 3.4:	Analysis of the nutrient potential of the hydrolysis waste	222
Table 3.5:	Metals analysis (in mg/Kg) of brewery wastewater and apple pomace wastes after hydrolysis.....	223
Table 3.6:	Characteristics of the diets produced with hydrolysis waste	224

CHAPITRE IV

Tableau 4.1:	Paramètres physico-chimiques	259
Tableau 4.2:	Caractéristiques des diètes produites avec les rejets hydrolysés	260
Tableau 4.3:	Influences des diètes alternatives sur la croissance du carpocapse de pomme	261
Tableau 4.4:	Bilan de masse (mg) de la quantité de diète ingérée par les larves.....	262
Tableau 4.5:	Bilan de masse des nutriments de la diète ingérée par les larves	263
Tableau 4.6:	Étude de l'activité enzymatique des larves de <i>Cydia pomonella</i>	264

ANNEXE I

Tableau 1:	Perte d'humidité des diètes à base des eaux usées d'amidon-EUA (a); Eaux usées de micro-brasserie (b) et boue des industries de jus de pomme-POM (c) comme une fonction de temps.	278
Tableau 2 :	Bilan de masse de la quantité des diètes assimilées (a); La quantité de protéines assimilées (b); La quantité de glucides assimilés (c); La quantité des lipides assimilés (d) par les larves durant leur croissance	279

Tableau 3 :	Taux d'éclosions des œufs, de croissance des larves et des adultes comme une fonction du temps d'élevage sur chaque diète: à base des eaux usées d'amidon (a); à base des eaux usées de micro-brasserie (b) à des boues d'industrie de jus de pomme (c).	280
Tableau 4 :	Influence du pH des différentes diètes sur l'éclosion des œufs et la croissance des larves.	281

ANNEXE II

Tableau 1 :	Profil de la viscosité en fonction du temps des diètes produite à partir: (a) Eaux usées de micro-brasserie; (b) les boues d'industrie de jus de pomme.	284
Tableau 2 :	Profil de la contrainte de cisaillement (a) et de la viscosité (b) en fonction du taux de cisaillement des diètes produites à base des EMB	285
Tableau 3a :	Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie	288
Tableau 3b :	Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des boues d'industrie de pomme	293
Tableau 4 :	Ratio des paramètres d'élevage (larves / œufs; adultes / larves; œufs / femelles) sur les différentes diètes en relation avec les tailles de particules	298
Tableau 5 :	Profil des nutriments (protéines, lipides et glucides) assimilés par les larves du carpocapse de pomme élevées sur les différentes diètes comme en fonction de la taille des particules	299

ANNEXE III

Tableau 1 :	Graphique des réponses de surface du pourcentage d'élevage des diètes EMB-GB (a); EMB-FS (b); POM-FS (c) et EMB-POM.	303
Tableau 2 :	Profil de la viscosité des diètes produites: (a) avec gélose et (b) sans gélose, comme une fonction de temps	304

ANNEXE IV

Tableau 1 :	Influences des diètes alternatives sur l'élevage du carpocapse de pomme	307
-------------	--	-----

ANNEXE V

Tableau 1 :	Le prix des différents ingrédients de la diète	323
-------------	--	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1.1:	Images d'une Larve (a) et des papillons (b) de <i>Cydia pomonella</i>	7
Figure 1.2:	Distribution du carpocapse de pomme de CMISS (Codling moth information support system).	10
Figure 1.3:	Représentation schématique des nucléopolyhédrovirus (NPV) et d'un granulovirus (GV) de la tordeuse de bourgeon d'épinette	15
Figure 1.4:	Diagramme du cycle d'infection du Baculovirus	16
Figure 1.5:	Schéma de l'élevage du carpocapse de pomme à l'échelle industrielle	38
Figure 1.6:	Représentation schématique de l'organisation du tube digestif des coléoptères et lépidoptères phytophages	42
Figure 1.7:	Schéma récapitulatif du plan expérimental.....	51

CHAPITRE II

Figure 2.1.1:	Loss of moisture of the diets based on starch industry wastewater-SIW (a); brewery wastewater-BWW (b) and apple pomace-AP (c) as a function of time;	112
Figure 2.1.2:	Mass balance of the quantity of diets assimilated (a); quantity of proteins assimilated (b); quantity of carbohydrates assimilated (c); quantity of lipids assimilated (d) by the larvae during their growth.	113
Figure 2.1.3:	Hatching of eggs, growth of larvae and adults as a function of rearing time on each diet: starch industry wastewater based (a); brewery wastewater based (b) apple pomace based (c).	114
Figure 2.1.4:	Influence of pH of the various diets on the hatching of eggs and growth of the larvae.	115
Figure 2.2.1:	Viscosity time profile of diets produced using: (a) brewery waste water; and (b) pomace waste	148
Figure 2.2.2:	Shear stress (a) and viscosity (b) profile as function of shear rate of diets produced using brewery wastewater	149

Figure 2.2.3:	Frequency distribution $dQ3(x)$ as a function of particle size of diets produced using brewery wastewater (a) and diets produced using pomace wastewater (b)	151
Figure 2.2.4:	Breeding ratios (larvae / eggs; adult / larvae; eggs / female) of different diets in relation to particle size	152
Figure 2.2.5:	Assimilated nutrients (proteins, lipids and carbohydrates) profile for larvae codling moth grown on different diets as a function of particle size.....	153
Figure 2.3.1:	Response surface graph of larval breeding percentage for BWW-WG diet (a); BWW-SF diet (b); POM-SF diet (c); and BWW-POM diet.	187
Figure 2.3.2:	Viscosity profile of the diets produced: (a) with agar; and (b) without agar, as a function of time.	187

CHAPITRE III

Figure 3.1:	Influence alternatives diets on codling moth breeding.....	225
-------------	--	-----

ANNEXES

Figure A-5.1 :	Mode de préparation de la diète standard	325
Figure A-5.2:	Microscopie électronique (x 40) des œufs et des larves de la PP : a) Lots d'œufs après pontes; b) Œufs éclos; c) Œufs non éclos- présence de larves; d) Larve mature.	327
Figure A-5.3:	Aspect visuel des différentes diètes produites;	327
Figure A-6.1 :	Schéma de production des Eaux Usées d'Amidon (EUA) prélevé à l'industrie ADM de Montréal.....	331
Figure A-6.2 :	Schéma de production des eaux usées de micro-brasserie.....	332
Figure A-6.3 :	Schéma de production des eaux usées de pomme	333
Figure A-6.4 :	Schéma de production des boues d'épuration de BSM	334

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
APHA	American Public Health Association
ARLA	Agence de réglementation de la lutte anti parasitaire
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BSM	Boue secondaire de municipalité
CP	Carpocapse de pomme
Contrôle	Diète contrôle fournie par la compagnie de Biotepp Inc
<i>CpGV</i>	<i>Cydia pomonella granulovirus</i>
CREE	Centre de Reproduction d'Entomologie et d'Entomopathogène
EL	Extraire de Levure
EUA	Eaux usées d'amidon
EMB	Eaux usées de microbrasserie
EMBH	Eaux usées de microbrasserie hydrolysées
NPV	<i>Nucleopolyhedrovirus</i> ; VPN en français : Virus de polyèdre nucléaire
PCC	Plan composite centré
pH	Potentiel d'hydrogène
POM	Boues issues du broyage, pressage et filtration des pulpes de pomme de l'industrie de jus de pomme Lassonde inc.
POMH	POM Hydrolysé
POM+FS	Extrait de levure et germe de blé substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+GB	Extrait de levure et farine soja substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+EL	Germe de blé et farine soja substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+FS+EL	Germe de blé substitué par les boues d'industrie de jus de pomme

POM+GB+EL	Farine de soja substitué par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+FS+GB	Extrait de levure substitué par les boues d'industrie de jus de pomme
MRS	Méthodologie de réponse en surface
ST	Solides Totaux
% p/v	Poids par unité de volume
% p/p	Poids par unité de poids

SIGLES

<i>Ga; Pa; La</i>	Glucides, protéines et lipides présentes dans les diètes assimilées
<i>Gc; Pc; Lc</i>	Glucides, protéines et lipides présentes dans les diètes consommées
<i>Ge; Pe; Le</i>	Glucides, protéines et lipides présentes dans les excréta
<i>Gr; Pr; Lr</i>	Glucides, protéines et lipides présentes dans les diètes résiduelles
<i>Gt; Pt; Lt</i>	Glucides, protéines et lipides présentes dans les diètes totales
<i>Me</i>	Masse des excréta rejetés par les larves
<i>Ma</i>	Masse des diètes assimilées par les larves après 28 jours
<i>Mc</i>	Masse des diètes consommées par les larves après 28 jours
<i>Mr</i>	Masse des diètes résiduelles après consommation des larves
<i>Mt</i>	Masse totale des diètes au jour j=0 juste avant l'élevage des larves

INTRODUCTION

Le carpocapse de pomme (CP), *Cydia pomonella* (L.), est le plus important ravageur des fruits à pépins (ex. pommes) et des noix dans le monde (Barnes, 1991; Cristián et Marcos, 2000; Lacey *et al.*, 2006). Toujours présent avec 95% d'infestation dans les régions de cultures de vergers, cet insecte inflige des dégâts évalués à 80% pour les pommes et à 60% pour les poires (Alson *et al.*, 2010; Brar *et al.*, 2008).

Les méthodes traditionnelles de contrôle contre le carpocapse de pomme (CP) sont dominées par les insecticides chimiques (les hydrocarbures chlorés, carbamates, pyréthroïdes, les régulateurs de croissance des insectes et les organophosphates tel que le Guthion, azinphos-méthyl), qui, selon plusieurs études épidémiologiques ont des effets délétères sur la santé humaine (cancers, affaiblissement du système immunitaire et neurologique, les perturbations du système endocrinien) et l'environnement. De plus, les populations de CP résistent de plus en plus aux pesticides chimiques (Dunley et Welter, 2000; Boivin *et al.*, 2001; Sauphanor *et al.*, 2006). Face à cela, les méthodes de contrôles biologiques et naturelles utilisant des parasites, des prédateurs, des pièges à phéromones, et des insecticides microbiens (bactéries, virus, fongicides) pour lutter contre le CP (Lacey et Siegel, 2000; Lacey et Unruh, 2005) ont été développées. Parmi ceux-ci, le contrôle biologique par le virus du granulovirus-CpGV (*Cydia pomonella granulovirus*) s'est avéré le plus efficace contre le CP (Brar *et al.*, 2008) et le plus sécuritaire pour l'environnement et les autres organismes bénéfiques pour la biodiversité (Ioriatti et Bouvier, 2000; Reuveny et Cohen, 2007). Ce bioinsecticide est produit en infectant, par des *granulovirus*, des larves du CP élevées sur des diètes spécifiques et commerciales. Malheureusement, le coût de la diète est exorbitant à cause du prix élevé de ses ingrédients (farine de soja, levure, germe de blé, vitamine, sels minéraux et agents antimicrobiens) qui représentent 35% du coût de sa formulation. Pourtant, ces ingrédients sont essentiels pour la croissance du CP, compte tenu de leur potentiel nutritif (Protéines, glucides, lipides et minéraux). Le coût de la diète influence aussi celui du Baculovirus, car dans la plupart des procédés de production, 40% du coût des biopesticides dépend aussi du prix élevé de la diète et aussi de son tarif d'importation qui est élevé, soit 110\$ / Kg pour la compagnie BioTepp Inc. du Canada (Brar *et al.*, 2008). Ce schéma typique est celui de toutes les compagnies spécialisées dans la production du biopesticide.

Ainsi, la nécessité de trouver un substrat nutritif économique et disponible pour remplacer certains ingrédients de la diète afin de réduire son coût s'impose. Ainsi, les études effectuées sur les eaux usées et les boues d'épuration ont montré que ces rejets sont des substrats alternatifs valables, du fait de leur potentiel nutritif très riche (Vidyarathi *et al.*, 2002; Brar *et al.*, 2006; Barnabé *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2009) et proche de celui des composants de la diète standard.

Par définition, une diète pour l'élevage d'insectes est définie comme un aliment synthétique ou semi synthétique de nature végétale ou animale qui est indispensable à la nutrition des insectes (Lacey et Shapiro, 2003; Sauphanor *et al.*, 2006). La plupart des insectes sont incapables de synthétiser certains nutriments nécessaires à leur croissance (Lacey et Unruh, 2005). Ces nutriments sont fournis par la diète. À cet effet, les diètes produites à partir des rejets doivent posséder une rhéologie (viscosité), des tailles de particules et un potentiel nutritif proche ou meilleur que ceux de la diète standard pour rentabiliser l'élevage du carpocapse de pomme, *C. pomonella*. Pour atteindre cet objectif, les rejets utilisés pour la production de la diète sont hydrolysés, lyophilisés et broyés.

La valorisation des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration comme matière première pour la production des biopesticides, des engrais biologiques, des bioplastiques et des enzymes est une approche novatrice et durable de la gestion des boues (Yezza *et al.*, 2005; Ben *et al.*, 2007). Toutefois, la faible biodisponibilité des nutriments dans ces rejets est un facteur limitant pour la réutilisation des eaux usées et des boues comme matières alternatives dans la bioconversion en produits à valeur ajoutée (PVA). En effet les nutriments sont insolubles et de plus piégés dans un complexe des matières en suspensions (agrégat de matières organiques, polymères extracellulaire ou PEC, cellules et débris cellulaires) où adsorbés sur leur surface. Le processus de prétraitement physique permet de solubiliser partiellement la matière organique des rejets, de modifier les propriétés physiques et rhéologiques et par conséquent d'augmenter la biodisponibilité des nutriments des rejets (Barnabé *et al.*, 2009; Pham *et al.*, 2010). L'hydrolyse simple, alcaline, thermique et thermo-alcaline (Vlyssides, 2004; Verma *et al.*, 2007; Barnabé *et al.*, 2009) et les mécanismes de la lyophilisation (processus de séchage) (Roux, 1994) sont les prétraitements utilisés pour augmenter la biodégradabilité et la biodisponibilité des nutriments dans les rejets et les diètes alternatives.

Compte tenu du potentiel commercial en produit en valeur ajoutée (PVA) des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration, le taux des contaminants (les métaux, les

pathogènes et les polluants organiques) contenus dans ces rejets doivent respecter les normes internationales en vigueur avant leur utilisation en industries et dans l'environnement (Harrison *et al.*, 2006).

En outre, la rhéologie des diètes d'insectes n'a jamais été évoquée dans la littérature. Aussi, l'étude de la viscosité (la résistance à l'écoulement) et des tailles de particules sont des paramètres importants pour définir la texture et la composition physique des diètes. En effet, l'hydrolyse et la lyophilisation jouent un rôle clé dans l'amélioration de la composition des diètes. Car ce prétraitement des eaux usées et des boues a été déjà utilisé dans la littérature pour fournir un excellent milieu rhéologique pour la production de biopesticides de *Bacillus thuringiensis* et des agents de biocontrôle *Trichoderma sp.* (Verma *et al.*, 2007).

L'optimisation des procédés de prétraitement (hydrolyse) a été effectuée en utilisant un plan expérimental simple composé de codes. L'effet du prétraitement d'hydrolyse a été évalué par l'augmentation de la solubilisation (glucide, lipide, protéine et métaux) et de la biodégradabilité (réduction des solides totaux-ST, de la matière en suspension-MES, de la viscosité et de la taille des particules) des rejets.

- Le chapitre 1 présente dans la première partie la synthèse de la recherche qui couvre certains aspects de la production d'une diète économique en utilisant les eaux usées et les boues comme agents nutritifs pour l'élevage du carpocapse de pomme (CP); l'étude de la rhéologie et de la taille des particules des diètes alternatives; l'hydrolyse des rejets agroindustriels sélectionnés pour améliorer le potentiel nutritif et la rhéologie des diètes afin d'améliorer l'élevage des larves. La deuxième partie est la revue de la littérature qui traite de la biologie et des caractères de *C. pomonella*, de la définition et des caractéristiques de la diète, et des effets du prétraitement d'hydrolyse sur la biodégradabilité des rejets agroindustriels. La troisième partie décrit les hypothèses scientifiques, les objectifs de la recherche et les discussions des résultats obtenus.

Originalité de la thèse

Ce travail fournira de nouvelles connaissances en bioconversion et sera une référence pour le développement de procédés de production de PVA qui utilisent la biomasse résiduelle comme substrat de base. Ce travail contribuera à faire des boues et des eaux usées des industries agroalimentaires une source nutritive alternative pour demain.

Organisation de la thèse

À la suite de ce chapitre de synthèse, les objectifs spécifiques de cette thèse sont traités à travers des articles scientifiques présentés par les 3 chapitres suivants:

- Le chapitre 2, composé de trois parties présentées sous formes d'articles de recherches, traite de la conception de la diète alternative à partir des eaux usées et des boues d'épuration. La première partie concerne la caractérisation et la sélection des rejets agroindustriels et municipaux utilisés comme agents nutritifs de la diète servant à l'élevage du carpocapse de pomme (CP). La deuxième partie traite de l'influence des propriétés physiques (La viscosité et la taille des particules) et chimique (pH et humidité) des diètes produites sur la croissance des larves du carpocapse de pomme, *C. pomonella*. La troisième partie présente l'optimisation de la production des diètes alternatives par la méthodologie des réponses de surface (MRS) afin d'améliorer l'élevage des larves du CP.
- Le chapitre 3 composé d'une seule partie, présente sous forme d'article de recherche l'influence du prétraitement d'hydrolyse des rejets sur le potentiel nutritif et les propriétés physiques des diètes produites en vue d'améliorer l'élevage du carpocapse de pomme.
- Le chapitre 4 composé d'une seule partie, discute de l'impact de l'activité enzymatique des larves élevées par rapport à la digestion de la diète et à l'assimilation des nutriments qui permettra d'établir un bilan de masse nutritif de ces larves élevées.
- Enfin, le dernier chapitre rapporte les conclusions découlant des résultats et discussion des objectifs de cette thèse. Cette partie est suivie par des recommandations proposées pour améliorer et optimiser les résultats finaux de cette étude.

CHAPITRE I :

SYNTHÈSE

Partie 1 Revue de littérature

1.1 Le Carpocapse de pomme

1.1.1 Définition, structure et biologie

Le carpocapse de pomme (CP), *C. pomonella* Linnaeus (L.), est un papillon de petite taille (Figure 1.1b) de la famille des Tortricidés qui compte plus de 8000 espèces nuisibles (Erlandson et Goettel, 2007). La larve (Figure 1.1a) de ce lépidoptère se développe à l'intérieur des fruits en causant d'importants dégâts pendant les étés chauds et humides (Welter, 2006). Natif de l'Europe et d'Asie, ce lépidoptère a été introduit en Amérique du nord vers 1750 (Welter, 2006; Lacey et Unruh, 2007). Chez le CP, la diapause obligatoire, permet de réduire la croissance et l'activité métabolique afin de s'adapter aux conditions défavorables (Knox *et al.*, 1994; Gordh et Headrick, 2001). La classification classique et la description structurale et biologique de ce lépidoptère sont présentées de façon détaillée au Tableau 1.1.



Figure 1.1: Images d'une Larve (a) et des papillons (b) de *Cydia pomonella*

Tableau 1.1: Description, Biologie et cycle de développement du carpocapse de pomme

Stades	Description	Biologie	Cycle de développement	Auteurs
Adultes	Petite taille (10 mm) Gris-bruns; Ailes antérieures grises (16-19mm); Ailes postérieure brunes rougeâtres; 2 antennes sur la tête	15 à 18 jours de croissance; Fécondité de 30 à 70 œufs; la 2 ^e génération a une fécondité de 100 œufs	Actif au crépuscule à 15-16°C (avril à septembre); le mâle vole en 1 ^{er} ; le climat influence le développement	Welty, 1992; Duval, 1994; Hull <i>et al.</i> , 2007
Les œufs	Forme de disques ovoïdes translucides (1-1,3 mm de diamètre);	Incubation de 18 jours à 15°C et de 6 jours à 25°C; Éclosent fin mai	Disposés par groupes de 3 à 20 sur les feuilles, rameaux et les fruits des vergers	Roberts et Hagley, 1986; Caprile et Vossen, 2005
Les larves	16 à 20 mm de long; rose pâle à rouge; une tête brune foncée; Corps formé de segments portant de fausses-pattes abdominales et des pattes anale sur la plaque thoracique ;	3 à 4 semaines de croissance selon les températures	Nait à la surface et croît dans les fruits. 4 ou 5 stades larvaires. les larves sont blanches pour le stade 1-2 et rose pour les autres stades; font leurs cocons sous l'écorce où les débris.	Welter, 2006; Alston <i>et al.</i> , 2010
Chrysalides	10 à 12 mm, Brun jaune, contenue dans un cocon soyeux	Dure 20 à 30 jours selon la température	début de l'hiver en avril, se nymphose et donnent des papillons de 2 ^{ème} génération, où entrent en diapause.	Welter, 2006; Alston <i>et al.</i> , 2010

Tableau 1.2: Classification classique du carpocapse de pomme

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Sous classe	<i>Pterygota</i>
Super-ordre	<i>Endopterygota</i>
Ordre	<i>Lepidoptera</i>
Sous ordre	<i>Microlepidoptera</i>
Famille	<i>Tortricidae</i>
Sous famille	<i>Olethreutinae</i>
Tribu	<i>Laspeyresiini</i>
Genre	<i>Cydia</i>
Espèce	<i>Pomonella</i>
Nom binominal	<i>Cydia Pomonella</i> (Linnaeus, 1758) <i>Laspeyresia</i>

1.1.2 Distribution géographique

Natif de l'Europe et de l'Asie, le CP a été introduit en Amérique du nord il y a 200 ans (Alston *et al.*, 2010). Chaque année, le nombre de générations varie selon les saisons locales, la latitude, l'altitude et la plante hôte (Normes OEPP, 2001). Ainsi, les générations diffèrent de l'Amérique du nord (1 à 2) en Asie (1 à 4) en passant par l'Europe (1 à 3) et l'Australie (1 à 3) (Erlandson et Goettel, 2007). Les oiseaux sont d'importants prédateurs des larves qui hibernent sous l'écorce. Les libres mouvements des fruits frais entre les pays permettent aux insectes de s'étendre aux régions non infestées (Mattedi *et al.*, 2006). Bien que son expansion en Afrique (Algérie, Égypte, Maroc, Afrique du sud, Tunisie, Zimbabwe), en Amérique du sud (l'Argentine, Brésil, le Chili, la Colombie, le Pérou, l'Uruguay), en Amérique du Nord (Canada, U.S.A, Mexique du nord et central), en Asie (Afghanistan, Azerbaïdjan, Chypre, Inde (Himachal Pradesh) Iran, Iraq, Israël, Kazakhstan, Lebanon, Pakistan, Sud de la Sibérie (Russie), Tadjikistan, Turquie, Turkménistan, Ouzbékistan, Zhejiang et Sin-Kiang Uigur (Chine)), en Europe (Tous les pays), en Océanie et Australie (Australie, Nouvelle Zélande) est limitée par plusieurs méthodes de lutttes (González, 2005), cet insecte demeure toujours un fléau pour les cultures de pommes à

cause du nombre variable de ces générations et de sa résistance aux pesticides chimiques utilisés (Figure 1.2).

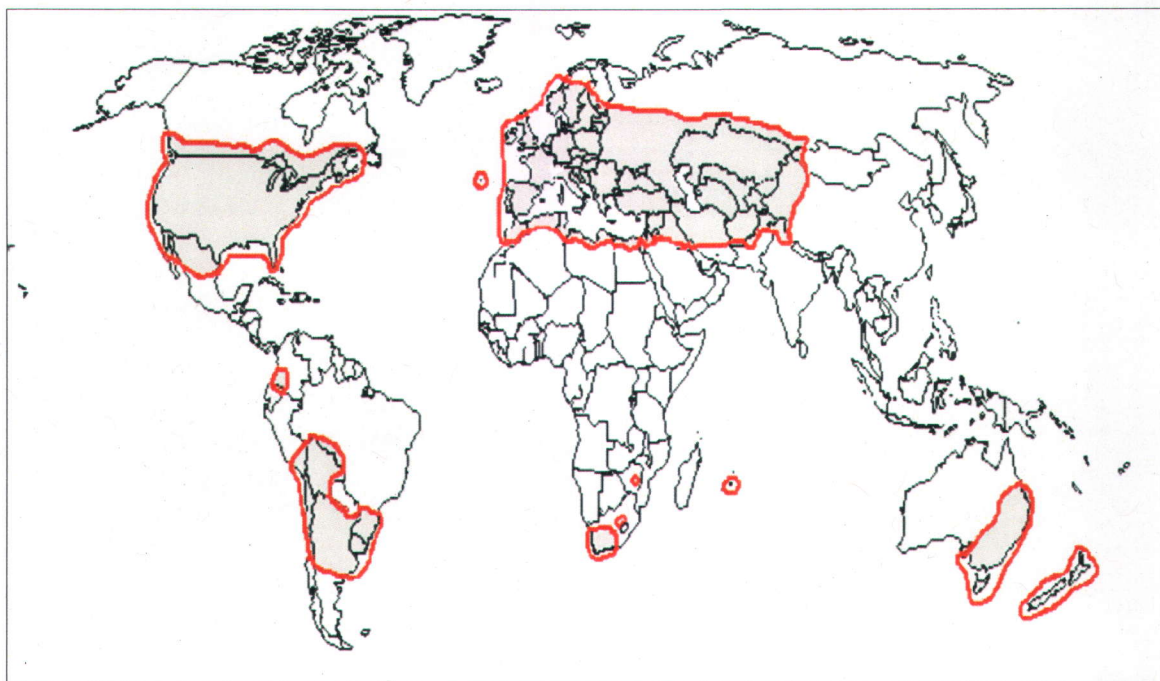


Figure 1.2: Distribution du carpocapse de pomme de CMISS (Codling moth information support system).

1.1.3 Symptômes et dégâts

Le CP cause des dommages énormes parmi les hôtes ciblés. Les infestations des larves sur le fruit sont caractérisées par des trous colmatés avec des déchets bruns (excréments) rejetés. Les dégâts causés sont de 2 types: 1) les piqûres provoquées par l'entrée des larves sur une courte distance dans la chaire; et 2) les profonds tunnels produits quand la larve pénètre dans la chaire du fruit pour se nourrir. Si ces larves restent incontrôlées, les dégâts causés peuvent atteindre 20 à 90% des fruits et 80 à 100% de ravages des récoltes. Soit 80% pour les pommes, 60% pour les poires et 10-15% pour les noix des vergers infestés (Caprile et Vossen, 2005). Les dégâts sont aussi causés par des cicatrices visibles lors de la cueillette des fruits. Ces trous favorisent la contamination indirecte des fruits (Stelljes, 2001). Les dégâts plus sévères lors des climats chauds où le CP obtient plus de générations par an (Welty, 1992), diminuent la valeur des pommes sur le marché du commerce et affectent l'économie des pays producteurs.

1.1.4 Moyens de lutte

Tableau 1.3: Les différentes luttres contre les insectes ravageurs

Moyens de lutte	Insectes Cibles	Description	Avantages	Désavantages	Références	
Insecticides	Chimiques	Carpocapse de pommes et autres insectes ravageurs	Pulvérisations d'insecticide (hydrocarbure chloré, organophosphoré, carbamate, pyréthroïdes, et les régulateurs de croissance)	Assez utilisé en agriculture et en forêt; Faible main-d'œuvre; Rendement élevé; coût acceptable	Incompatible avec d'autres méthodes; Risques élevés pour la santé et l'environnement; Énergie élevée; Apparition de résistances chez l'insecte	Hardie <i>et al.</i> , 1997; Dhadialla <i>et al.</i> 1998; Vincent, 1998; Reuveny et Cohen, 2007
	Biologiques	Carpocapse de pomme et autres insectes ravageurs	insecticides microbiens, tel que le <i>Bt</i> (Dippel, Javelot, Biobit, Crymax), le CpGV (Virosoft, Cyd-X, Carpovirusine) et le spinosad; Insectides végétaux	Compatible avec les autres méthodes; Sécurité Élevé; Faible énergie; Bon rendement élimine 80% des larves et 95% des trous des pommes	Forte application (3 à 10 jours) pour être efficaces; Main-d'œuvre Élevée	Vincent et Coderre, 1992; Guillon et Biache, 1995; Charmillot <i>et al.</i> , 2000; Vincent et Panneton, 2001
Confusion sexuelle	Carpocapse de pomme et autres insectes ravageurs	Les phéromones pour empêcher l'accouplement des papillons par l'odeur en trompant les mâles	Efficace avec les substances synthétiques (Isomate C+, Isomate CTT, No Mate, CheckMate)	Coûteux; utilisation abusif inefficace pour les petits vergers;	Caprile et Vossen, 2005; Alston <i>et al.</i> , 2007; Hansen et Anderson, 2006	
Luites sanitaires	Carpocapse de pomme et autres insectes ravageurs	L'élimination des écorces, branches, et des fruits justes après la récolte pour détruire les sources de chrysalides, larves, d'œufs	Moins couteux et pas toxiques Pas d'énergie	Mains d'œuvres élevées	Hall-Beyer et Richard, 1989; Duval, 1994; Panneton <i>et al.</i> 2000;	

Tableau 1.3: Les différentes luttres contre les insectes ravageurs (suite)

Moyens de lutte	Insectes cibles	Description	Avantages	Désavantages	Références	
Pièges de capture	Physique	Carpocapse de pomme, la tordeuse de chenille et autres insectes	Forces pour enlever les insectes -Installation des cartons sur l'arbre pour recueillir les larves; ensachage des fruits	Compatible d'autres méthodes -Sécurité et rendement élevé. Faible énergie. Faible zone traitée	Faible Application. Main-œuvre élevée. énergie élevé rendement faible -Négligeable sur le Marché	R.J.A.E., 1991; Welty, 1992; Judd <i>et al.</i> 1997 : Panneton <i>et al.</i> , 2000; Lacey et Arthurs, 2005; Kuhrt <i>et al.</i> , 2006
	Olfactif	Carpocapse de pomme	Pulvérisation de liquides attirant Les papillons	Compatible avec les autres méthodes	Énergie et coût élevés; pratique non efficace	Duval, 1994
	Lumineux	Carpocapse de pomme	contrôle du carpocapse à l'aide de la lumière	Compatible avec les autres méthodes	Énergie et coût élevés; Pratique non efficace	Caprile et Vossen, 2005
Contrôle Biologique	Classique	Carpocapse de pomme et autres insectes	lâchers de prédateurs ou parasites dans une région où il n'y a pas de contrôle	-Faible énergie -Compatible d'autres méthodes -Sécurité Élevé	faibles Application Main-d'œuvre élevée Rendement Variables	Roger <i>et al.</i> , 1995; Kienzie <i>et al.</i> , 2002; Reuveny et Cohen, 2007
	Inoculation	Carpocapse de pomme	Lâchers d'ennemies naturels par saison pour rétablir l'équilibre	- Faible énergie -Compatible avec autres méthodes -Sécurité Élevé	faibles application; Main-œuvre Élevée; Rendement et sécurité Variables	Vincent et Coderre, 1992; Giroux <i>et al.</i> 1994; Kienzie <i>et al.</i> , 2002
	Inondation	Carpocapse de pomme	production et libération d'ennemies naturels pour le contrôle rapide des insectes	- Peu de Machine - Pas d'énergie	science rarement prévoyante, main-d'œuvre élevée rendement Variables	Duval, 1994; Reardon et Berkett, 2003; Alston <i>et al.</i> , 2010

1.2 Baculovirus

1.2.1 Définition et structure

Dans le souci de protéger les vergers et les forêts contre les insectes nuisibles, et de réduire l'utilisation des insecticides chimiques, des agents biologiques microbiens ont été développés (Huber, 1986; Wood et Granados, 1991). Parmi ces agents, les granulovirus (GV), très pathogènes et sélectifs pour le CP sont utilisés pour lutter contre ce ravageur (Lacey *et al.*, 2005a; Weeden *et al.*, 2008). Ce virus, de 30-60 nm de diamètre et 250-300 nm de longueur, en forme de bâtonnet, de la famille des *Baculoviridae*, qui est divisée en deux sous-familles: les *Eubaculovirinae* avec les *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) et les *Granulovirus* (GV), et les *Nudibaculoviridae*. Découvert pour la 1^{ère} fois dans les larves mortes dans un verger mexicain en 1960 (Tanada, 1964), seule l'espèce des *Granulovirus* (GV) est utilisée pour infecter *Cydia pomonella*. Ce qui a conduit à la création du nom «*Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) » (Federici, 1997; Ballard *et al.*, 2000). Ce Virus à ADN bicaténaire a son nom qui dérive de l'apparence granulaire des occlusions de protéiques (granules) du manteau qui protège le virion (Figure 1.3) (Helsen *et al.*, 1992; Arthurs et Lacey, 2004). Le virion, particule contagieuse du *Baculovirus*, est protégée par un manteau de protéine (granuline ou polyèdrine) qui le rend plus résistant aux conditions (chaleur et pH) de l'intestin des insectes et aux facteurs abiotiques (l'UV, la température et l'humidité), et plus persistant dans l'environnement (Carruthers *et al.*, 1988; Cory et Myers, 2003; Lacey *et al.*, 2004).

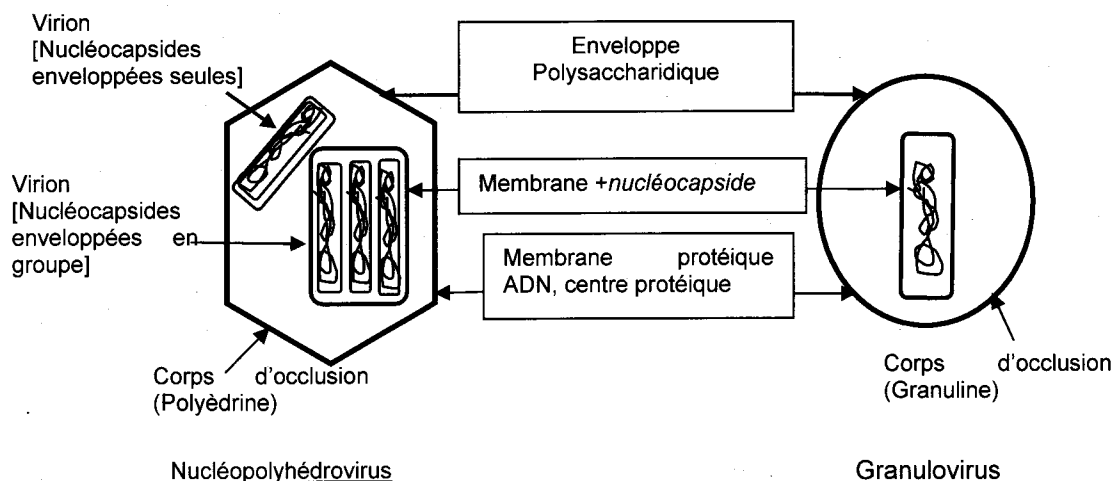


Figure 1.3: Représentation schématique des nucléopolyhédrovirus (NPV) et d'un granulovirus (GV) de la tordeuse de bourgeon d'épinette (Modifié de la source: Basil, 2003).

1.2.2 Cycle d'infection et production commerciale du Baculovirus

Chez les lépidoptères, les *Baculovirus* infectent seulement les larves pendant la phase de l'alimentation et forment des corps d'occlusion (CO) qui contiennent les virions infectieux. Les corps d'occlusion se reproduisent à l'intérieur des cellules intestinales ou graisseuses des lépidoptères, après ingestion du *Baculovirus* (Cory et Myers, 2003). Parfois, la présence des *nucléopolyhédrovirus* (NPV) ou des *granulovirus* (GV) est observée chez les chrysalides et les adultes. Pour la formulation commerciale de CpGV, les larves néonates du CP exposées au traitement de CpGV s'infectent en ingérant les corps d'occlusions protéiques (Ballard *et al.*, 2000; Cossentine et Jensen, 2004; Lacey *et al.*, 2005b). Les virions ingérés, se multiplient directement dans l'hôte infecté si celui-ci est sensible, mais reste latent chez l'hôte non sensible (Weeden *et al.*, 2008). La réussite de l'infection dépend de l'invasion et de la reproduction du *Baculovirus* dans le corps de l'hôte (DeFillippis et Villarreal, 2000) (Figure 1.4). Les larves néonatales peuvent aussi être infectées via les œufs contaminés par le virus lors de l'éclosion (Lacey et Arthurs, 2005).

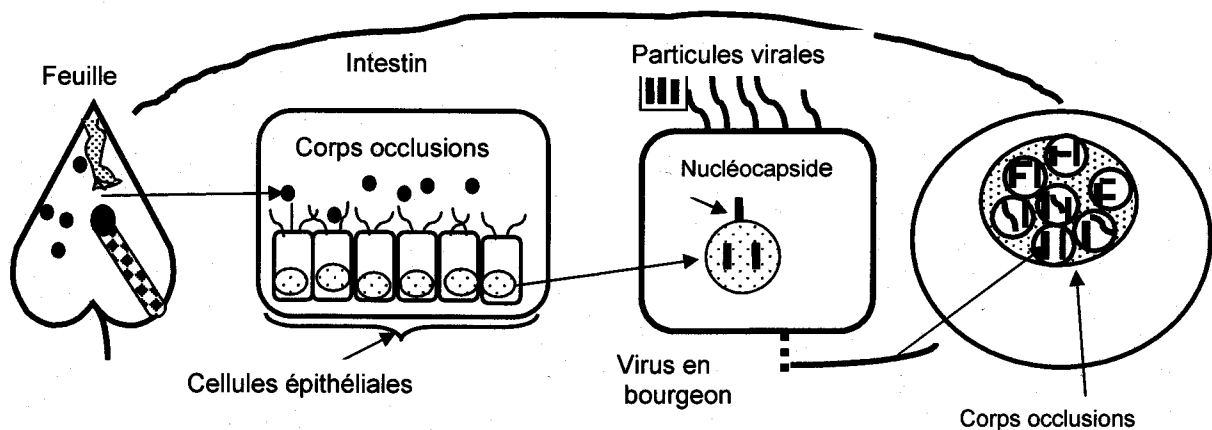


Figure 1.4: Diagramme du cycle d'infection du Baculovirus

La LD_{50} du CpGV pour les larves néonatales de CP est estimée à 2 granules viraux/larve (Huber, 1986). Selon Steineke et Jehle (2004), le niveau de contrôle acceptable du carpocapse de pommes (CP) est observé seulement après une application abondante du virus (10^{12} à 10^{13} granules/ha). Chez certaines compagnies (ex. Biotep), on obtient en moyenne 10^9

granules/larves et 60 larves par barquette de diète. Contrairement aux produits chimiques, les contrôles de *Baculovirus* présentés au Tableau 1.4 sont plus sécuritaires pour l'environnement et la santé humaine, et plus compatibles aux autres méthodes de contrôle. Car les *Baculovirus* sont incapables de reproduire dans l'estomac à pH acide (1,7) des humains, contrairement à l'estomac à pH basique (9) des larves de *C. pommonella* qui est favorable à leur croissance. Ces biopesticides ont la capacité de s'adapter aux mutations des insectes hôtes afin de mieux contrer leur résistance aux virus. Les *Baculovirus* peuvent remplacer 80% des insecticides chimiques actuellement utilisés en agriculture et en foresterie.

Tableau 1.4: Baculovirus utilisé comme insecticide biologique dans les vergers

Produits	Virus utilisés	Produits	Fournisseurs
Pomme, poire, noix, prune, Coings, Abricots, Pêches, Amandes, Nèfles, Oranges, Pruneaux, Noisetiers	Virus de la granulose de mite <i>Cydia pomonella</i> <i>granulosis virus (CpGV)</i>	Cyd-X	Thermo Trilogy Corp.
	CpGV	Carpovirusine 2000	Novartis Crop Protection
	CpGV	Granupom	BioBest Biological Systems.
	CpGV	Madex	Andermatt Biocontrol AG.
	CpGV	Virosoft	BioTepp

1.3 Diète d'insectes

1.3.1 Définition et Historique

La diète est un mot communément utilisé pour qualifier le régime alimentaire des êtres vivants dans le but thérapeutique et hygiénique. La diète d'insecte est un aliment végétal, animal ou synthétique de constitution chimique ou naturelle utilisée pour l'élevage des insectes dans le cas de cette étude. Cet aliment peut être une source riche en éléments nutritifs (protéines, glucides, lipides, vitamines, minéraux, eau, etc.) et non-nutritifs (phénols, polyphénols, monoterpènes, glucosinolates, alcaloïdes, etc.) (Cohen, 2001). Ces éléments déterminent la qualité de la diète et par conséquent la santé de l'insecte.

Les insectes élevés sur des diètes artificielles sont utilisés comme agents de contrôle biologique (Knippling, 1979), comme nourriture des autres animaux (Versoi et French, 1992), comme produits pharmaceutiques, protéines recombinantes (Hughes et Wood, 1998) et comme nourriture pour la population (DeFoliart, 1999).

L'élevage des insectes a commencé depuis longtemps avec celui du ver à soie *Bombyx mori*. Mais, l'histoire de l'élevage des insectes sur les diètes synthétiques a débuté depuis très longtemps avec la diète artificielle de Bogdanow (1908) pour *Calliphora vomitoria* (L.). Cette diète était composée de peptone, d'extrait de viande, d'amidon et de minéraux (Singh, 1977) en partie. L'analyse de la composition biochimique des protéines (l'acide aminé), lipides, glucides et minéraux de la diète permet d'avoir une connaissance fondamentale de la physiologie digestive et en donnant un aperçu des besoins nutritionnels de l'insecte. Ainsi, pour House (1974), basée, en grande partie sur le travail empirique, la production des diètes implique l'ajout de substances nutritives sélectives qui varient en quantités selon les espèces. Car les insectes, comme tous les autres êtres vivants, ont besoin de se nourrir pour survivre.

Pour Arijs et De Clercq (2004), les diètes sont de 3 types: les diètes oligidiques constituée de fraction organiques (tel que la viande et les végétaux); la diète holidique définie par les composants chimiques (acides aminés, acides gras, sucres, les vitamines et les antibiotiques) et la diète méridique qui est une diète holidique basée sur une où plusieurs substances chimiques ou naturelles inconnues (la levure, le foie de bœuf...). Selon Cohen (2004), la diète indique toutes les substances synthétiques, organiques ou non qui constituent l'aliment des insectes.

1.3.2 Diètes standards ou conventionnelles

La plupart des diètes conventionnelles utilisées pour l'élevage du carpocapse de pomme et des autres lépidoptères sont préparées à partir de composants naturels (viande de bœufs, œufs ou jaune d'œufs), de substance semi-synthétique comme la farine de soja, les germes de blé, la levure de bière, d'haricot, de la gélose (agent gélifiant) et des additifs synthétiques tels que le sucrose (glucide), les vitamines (vitamines vander zan't et l'acide ascorbique), les sels minéraux (mixture de sel wesson), les agents de conservations (le méthyle parabène hydroxy-benzoate, acide ascorbique et l'acide sorbique), et souvent la fibre de soja décortiqué (agent absorbant d'eau) qui améliore la texture de la composition de ces diètes (Wiggins, 2004). Ces composants présentés dans la section précédente et définies dans le Tableau 1.5, dispendieux, peu disponibles et pas souvent de qualités peuvent être remplacés par les rejets agroindustriels et municipaux pour la préparation d'une diète alternative plus économique.

1.3.3 Diètes alternatives ou non conventionnelles

La production de la diète d'insectes à partir des rejets solides agroindustriels n'a fait l'objet d'aucune recherche au niveau scientifique et industriel. Néanmoins, les agents de biocontrôle (*Bacillus thuringiensis-Bt*, et des champignons *B. bassiana* et *Trichoderma*) sont produites à partir de plusieurs substrats (déchets de riz, de canne à sucre et de jus de fruits, amidon de tapioca et l'huile végétale) à travers les centres de recherches (ex. Centre de Reproduction d'Entomologie et d'Entomopathogène-CREE de Cuba) et les industries (Dossier Biocontrôle, 2005; Adjallé *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007).

Par contre, les eaux usées agroindustrielles et les boues d'épuration municipaux, localement disponibles et faciles à manipuler (Tyagi *et al.*, 2002; Lamontagne, 2004; Yezza, 2005) ont permis de produire des biopesticides (*Bacillus thuringiensis-Bt*, *B. bassiana* et *Trichoderma*), des biofloculants et des bioinoculants (Brar *et al.*, 2006; Adjalle *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007) économiques en industrie et dans les laboratoires scientifiques comme celui de l'INRS-ETE. Fort de cette expertise, ces rejets, à cause de leur potentiel nutritif très élevé en protéines, en polysaccharides et en lipides (Vidyardhi *et al.*, 2002; Brar *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2007; Barnabé *et al.*, 2009) sont utilisés comme un milieu nutritif alternatif à certains composants de la diète conventionnelle. Les diètes alternatives ont été utilisées pour les tests d'élevage du

carpocapse de pomme *Cydia pomonella* en vue de produire le bioinsecticide à base de *Baculovirus*.

1.3.4 Les composants nutritifs des diètes d'insectes

Les composants (farine de soja, extrait de levure, germe de blé, viande de bœuf...) habituellement ajoutés à la diète comprennent les glucides, les protéines, les lipides, les vitamines et les minéraux (Toba et Howell, 1991; Hansen et Anderson, 2006). Les autres ingrédients ajoutés régulièrement sont des émulsifiants, des stabilisants et des agents gélifiants qui sont considérés par Cohen (2004) comme les ingrédients les plus vitaux des diètes d'insectes. Les agents de conservation (antimicrobiens et les antioxydants) et les additifs (composés phénoliques, flavonoïdes, terpenoïdes) très importants, sont recommandés par les entomologistes et les chercheurs des sciences alimentaires dans la production des diètes (Carroll et al., 1997; Johnson et Felton, 2001). La section précédente et le Tableau 1.5 discute de l'importance et du rôle de chaque nutriment présent dans la diète.

Protéines

La plupart des insectes ont besoin d'une certaine quantité de protéines dans leur diète pour une meilleure croissance et une meilleure reproduction. Ces protéines varient en quantité et en qualité selon l'espèce et sont importantes comme structure réceptrice de transport et de stockage des enzymes (Chapman, 1998). Beaucoup d'insectes digèrent les protéines durant leur alimentation en vue d'obtenir les acides aminés. Haydak (1953) a montré que les blattes ont une croissance lente, mais une longévité prolongée lorsque la teneur en protéine de la diète est restreinte (49 et 78 %). Certains insectes utilisent aussi pour leur longévité de survie une faible quantité de protéine (22 à 24 %). La plupart des insectes femelles adultes nécessitent des protéines pour la maturité de leurs ovaires et de leurs œufs (Genc, 2006). Les insectes mâles adultes n'ont pas besoin de protéine pour la maturité de leur sperme. En général, les besoins nutritionnels changent avec l'âge, le sexe et le stress physiologique (Nation, 2001).

Les acides aminés (aa) essentiels (arginine, histidine, leucine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine) qui ne peuvent pas être synthétisés ou sont synthétisés en quantité insuffisante par les insectes. Ces acides aminés (aa) doivent être apportés par l'alimentation des insectes, car ils sont indispensables pour la croissance et la morphologie de ceux-ci (Cohen, 2004). La tyrosine est cruciale pour la sclérotisation de la cuticule, le tryptophane pour la synthèse des pigments (Genc, 2006) et l'acide γ -aminobutyrique

et glutamate sont connus comme étant des neurotransmetteurs. La proline est essentielle comme source d'énergie et la croissance de plusieurs espèces de diptères. L'acide Aspartique et l'acide glutamique sont importants pour la croissance *Phormia sp.* et *B. mori* (Chapman, 1998). Par conséquent, les substrats nutritifs utilisés pour remplacer les ingrédients de la diète standard, afin de réduire son coût, doivent avoir une concentration élevée en protéines pour rentabiliser la culture du carpocapse de pomme.

Glucides

Les insectes utilisent les glucides comme matériel de construction (la cuticule contient un polysaccharide appelé chitine) et comme meilleure source d'énergie (Chippendale, 1978; Cohen, 2004). Selon House (1974), les glucides utilisés dans les diètes sont spécifiques et facilitent la digestion intestinale des insectes. Un glucide fonctionnel peut apparaître quelque fois comme un non fonctionnel, s'il n'est pas efficacement ingéré. Ceci peut être le cas de l'absence des autres substances phagostimulatrices comme le sucrose (Nation, 2001). Les glucides sont très importants pour les insectes, mais ne sont pas essentiels, car ils peuvent être synthétisés à partir des lipides ou des acides aminés (Nation, 2001). Les glucides peuvent être convertis en lipides et peuvent aussi contribuer à la production des acides aminés (Vanderzant, 1974).

Les glucides, constituant 12,9 % de la diète standard, ont une importance nutritive de la composition des ingrédients utilisés pour la production de la diète. L'utilisation des glucides dépend de l'habilité des insectes à hydrolyser les polysaccharides et la digestion des structures plus complexes (Genc, 2006). Chez certains insectes, du genre *Tenebrio*, *Ephestia*, et *Oryzaephilus Tenebrio sp.*, la croissance s'arrêtera si le contenu de glucide représente moins de 40 % de la diète. La croissance de l'insecte est meilleure si le contenu des glucides atteint 70 % de la diète (Chapman, 1998).

Les larves d'abeilles ont besoin de glucide pour se transformer en chrysalides (Nation, 2001). Chez certains insectes, la larve et l'adulte peuvent utiliser les glucides différemment. Par exemple, la larve d'*Aedes spp.* utilise l'amidon et le glycogène, mais l'adulte ne peut pas les utiliser (Chapman, 1998). Les Lépidoptères, des Orthoptères et certains Homoptère utilisent aussi bien les glucides que les lipides pour fournir l'énergie pour le vol (Nation, 2001, Chapman, 1998). Par conséquent, les substrats nutritifs utilisés pour remplacer les ingrédients de la diète standard, afin de réduire son coût, doivent avoir une concentration élevée en glucide et contribuer à améliorer l'élevage du carpocapse de pomme.

Lipides

Les lipides sont des composants principaux des cellules qui se retrouvent dans la diète des insectes sous formes d'acides gras (nécessaires pour la différenciation et la croissance) (Turunen, 1979) de phospholipides (principales composantes des parois cellulaires) et des triglycérides (jouent un rôle fondamental dans le stockage de l'énergie) (Nation, 2001). Les insectes sont capables de convertir les glucides en lipides et de synthétiser les lipides accumulés dans les tissus gras (Vanderzant, 1974). Plus de 50 espèces de lépidoptères et d'autres insectes, nécessitent comme source diététique d'acides gras polyinsaturés, les acides linoléiques et linoliques (Nation, 2001).

Les papillons, déficients en acides gras, ont des défauts dans la formation des ailes et de leur équilibre physiologique lors de l'éclosion à partir des chrysalides (Vanderzant, 1974).

Tous les insectes ont besoin de stérols dans la diète, car ils ne peuvent pas les synthétiser, ou ne peuvent pas en synthétiser assez pour satisfaire à leurs exigences physiologiques. Un stérol est le précurseur pour synthétiser l'ecdysostéroïde à 27 carbones pour la mue de l'hormone d'insectes. Ainsi, le manque de stérols aboutit à l'incapacité des insectes à muer. Ces insectes meurent typiquement dès les premiers instants (Nation, 2001).

La faible quantité de lipides ou de stérols dans une diète, chez l'insecte femelle adulte, aboutit à une réduction de 80 % de l'éclosion des œufs, bien que la fécondité ne soit pas affectée (Nation, 2001). La faible concentration en lipides (6,3% de la diète) présentes dans les composants de la diète standard montre que les insectes utilisent une faible quantité pour leur croissance. Par exemple, 0,5% d'huile de graine de lin fournisse suffisamment de lipides non coûteux.

Vitamines

Les insectes utilisent une bonne source de 7 vitamines dans leur alimentation: thiamine, riboflavine, acide nicotinique, pyridoxine, acide pantothénique, acide folique et la biotine (Genc, 2006). Même en faible quantité, ces vitamines sont essentielles pour le bon fonctionnement et la croissance de l'insecte, car celui-ci ne peut pas les synthétiser (Cohen, 2004). L'étude d'une espèce de moustique, le *Culex pipiens*, a montré son besoin pour les sept vitamines (Dadd, 1985). Ces Vitamines jouent un rôle de cofacteurs d'enzymes catalysées par voies métaboliques. La Biotine est reconnue comme un cofacteur de plusieurs étapes enzymatiques dans la synthèse des acides gras et un composant de l'enzyme du pyruvate carboxylase (Tu et

Hagedorn, 1992). L'acide folique est exigé pour la biosynthèse des acides nucléiques. Le β -carotène est très important dans la diète pour la pigmentation normale des insectes. L'absence de β -carotène réduit la mélanisation et les insectes ne développent pas leurs couleurs jaunes et vertes normales (Chapman, 1998). Pour cela, la morphologie normale des yeux des insectes est affectée durant leur croissance (Nation, 2001). La vitamine E est exigée pour la reproduction chez certains insectes et l'acide ascorbique est essentiel pour permettre une croissance normale des insectes (Nation, 2001).

Les vitamines représentant 2,1 % de la diète standard sont essentielles pour la croissance des insectes. Par conséquent, elles sont ajoutées durant la préparation de la diète par certaines vitamines synthétiques (Vitamine Vanderzant's et l'acide ascorbique). Ces vitamines ne peuvent pas être remplacées par d'autres substrats naturels qui en contiennent peu (Vanderzant, 1974).

Minéraux

Les besoins en minéraux des insectes sont méconnus par les industriels et les scientifiques. L'étude de la composition de la diète des insectes permet de comprendre que certains minéraux comme le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le chlorure et le phosphate sont essentiels pour la fonction des insectes (Nation, 2001; Cohen, 2004). Le molybdène, une partie de la xanthine déshydrogénase, est un ion métallique essentiel comme cofacteurs d'enzyme et important dans le métabolisme de la purine des insectes (Nation, 2001). Les insectes ont besoins de peu (traces) de fer, de calcium et de sodium, mais d'une plus grande quantité de potassium (Nation, 2001).

La mixture de sel Wesson utilisée comme source de minéraux contient une teneur élevée en Ca, Fe, et Na (Osborn et Mendel, 1932). Ce sel jouant un rôle important chez les insectes, participe particulièrement à la conduction de l'influx nerveux, à la contraction musculaire et à la rétention de l'eau par les organes.

Néanmoins, cette mixture n'est pas efficace pour maintenir le développement de la pyrale de maïs sur une diète artificielle (Nation, 2001). De plus, la teneur de Ca de cette mixture est toxique pour *Blatella germanica* (Gordon, 1959). Par contre, la mixture de sel Beck supporte le développement de la pyrale de maïs (Beck *et al.*, 1968) et des autres lépidoptères (Genc et Nation, 2004).

Les eaux usées agroindustrielles et les boues municipales sont des composants riches en macro et micronutriments (Frolund *et al.*, 1995) qui peuvent être utilisées comme sources de minéraux pour préparer la diète. Toutefois, ces rejets ne peuvent probablement pas remplacer

qualitativement les minéraux fournis par les ingrédients de la diète conventionnelle. En effet, ces sels normalement utilisés sous forme synthétique (mixture de sel Wesson) et complexe ont un coût d'achat qui n'influence pas le coût de la diète.

Antimicrobiens

Les agents de conservations (antibiotiques) sont importants dans les diètes, car ils contribuent à leur stabilité et leur protection contre les microorganismes. Ces agents participent au bon déroulement de l'élevage des lépidoptères et sont fournis lors de la production des diètes par l'acide ascorbique, l'acide propionique, le méthyle parabène hydroxy-benzoate (MPH) et l'acide sorbique. Ces substances antimicrobiennes étant aussi des vitamines (Cao et Prior, 1999; Gao *et al.*, 2000), fonctionnent comme des agents de conservations (stabilisants) et des antioxydants de la diète (Cohen, 2004) qui interviennent dans le fonctionnement et le métabolisme des organes des insectes. Ces agents antibiotiques protègent la diète contre les infections fongiques et bactériennes (Wiggins, 2004) et stabilisent le pH de la diète autour de 6, favorable à la croissance des lépidoptères (Cohen, 2004).

Phagostimulants

Les Phagostimulants sont des composés chimiques qui stimulent l'alimentation des insectes (Nation, 2001). Ce sont des facteurs qui permettent l'acceptation où le rejet des aliments chez les insectes, grâce aux récepteurs de goût placés sur les mandibules, les tarsi, les antennes ou d'autres parties du corps qui permettent de goûter et d'identifier les produits alimentaires (Kim et Mullin, 1998; Nation, 2001).

Les phagostimulants peuvent être des composants nutritionnels où produits chimiques non nutritionnels. Les phagostimulants agissent différemment sur les insectes qui peuvent retrouver à travers eux une alimentation équilibrée. Certains insectes s'alimentent continuellement, tandis que d'autres arrêtent de se nourrir quand ils sont rassasiés, même en présence de stimulus alimentaires. Les sucres, hexose et sucrose, sont généralement considérés comme les principaux phagostimulants dans la diète des insectes (Chapman, 1998).

Les glucosides, une combinaison de glucose avec une moitié sans sucre, ont un rôle de phagostimulants pour certains insectes (Nation, 2001). L'adénosine triphosphate (ATP) en présence d'ions de sodium est un phagostimulant pour *Aedes aegypti*. Les lipides, phospholipides, triglycérides, stérols, esters et des acides gras sont d'habitude des phagostimulants important pour la plupart des insectes (Nation, 2001).

Les phagostimulants ne peuvent pas être retrouvés dans les rejets. Ces composants doivent être ajoutés à la diète par le biais des substances chimiques pour accroître l'alimentation des insectes.

Tableau 1.5: Les composants standards d'une diète conventionnelle pour l'élevage des espèces de lépidoptère

Composants	Rôle	Composition	Source	Auteurs
Protéine	Fonctions des organes; croissance et transport	Acides aminées; Azote, carbone et hydrogène	Farine de soja, levure, blé, viande, jaune d'œuf ...	Cohen, 2004 Hansen et Anderson, 2004
Glucide	Fonctions de construction (la cuticule contient un polysaccharide appelé chitine) et de source d'énergie (stockage)	Amidon, dextrine, cellulose et glycogène...	Sucrose; Farine de soja, levure, blé, viande, jaune d'œuf	House, 1974; Chippendale, 1978; Cohen, 2004
Lipide	Différenciation cellulaire et la croissance; les principaux composants de membranes cellulaire stockage d'énergie	Phospholipides, triglycérides, acides gras, glycérols	Huiles végétales (lin) ou synthétiques	Turunen, 1979
Sels minéraux	Conduction de l'influx nerveux, contraction musculaire et la rétention d'eau par les organes	Calcium, fer; Magnésium, Phosphore; Potassium, Sodium, Zinc; Cuivre, Manganèse; Sélénium...	mixture de sel Wesson et autres sels	Cohen, 2004
Vitamines	Métabolisme essentiel et croissance; synthèse du matériel génétique (hormones); liés aux protéines pour former des enzymes actives dans les réactions chimiques	Acide ascorbique; Thiamine; Riboflavine; Nicotinique Acide; Pathogénique Acide; Vitamine B ₆ ; Folique Acide; Vitamine B ₁₂ Biotine, Inositol; Choline Chloride ; Vitamin A et E	Vander zant's	Cohen, 2004 Cohen, 2000 Toba et Howell, 1991
Agents de conservation	composés antimicrobiens et/ou des vitamines, fonctionnant comme des stabilisateurs de diète	Ascorbique Acide, acide propionique, méthyle parabène hydroxy-benzoate et acide sorbique.	Agents antimicrobiens et antioxydants	Cao et Prior, 1999; Gao <i>et al.</i> , 2000
Agents gélifiants	Solidifie la diète	Gélose	Agar, amidon, tapioca	Johnson et Felton, 2001
Eau	Facteur clé des réactions physiques et chimiques	Molécules d'H ₂ O	Eau distillée stérilisée	Cohen et Patana, 1982; Cohen, 2000

1.4 Prétraitement des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration

1.4.1 Hydrolyse

L'hydrolyse (totale) signifie la conversion de molécules lentement biodégradables par une réaction avec l'eau en composés de faible poids moléculaire facilement biodégradables comme les acides gras volatils (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). Ainsi que 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).

Les réactions d'hydrolyse peuvent entraîner la lyse des cellules où le bris des débris cellulaires. Ainsi les polysaccharides, les polypeptides et les acides nucléiques (PEC: polymères extracellulaires) contenus à la surface où à l'intérieur des cellules et des membranes cellulaires sont alors libérés et peuvent entre autres piéger l'eau et augmenter la viscosité. Les acides humiques, les lipides et les polymères (glycoprotéines) sont d'autres PEC. Les réactions d'hydrolyse peuvent aussi libérer les PEC adsorbés sur les particules des eaux de rejets agro-alimentaires.

Toutefois, très peu de recherches ont été effectuées sur l'hydrolyse des boues de rejets agro-alimentaires pour en faire une matière première nutritive de qualité pour la production d'une diète d'insecte. Seul Odegaard *et al.* (2002) évoquent la possibilité d'intégrer des boues hydrolysées dans une série de traitements biologiques visant à produire des bio-fertilisants, de l'énergie et des sources distincts d'éléments nutritifs (carbone, azote et phosphore). Les articles répertoriés indiquent que les réactions d'hydrolyses sont excellentes pour solubiliser partiellement les eaux usées et les boues agro-industrielles afin d'augmenter la performance des procédés biologiques. Les rejets agro-industriels et municipaux sont des matières complexes pour la production d'une diète. Ainsi, le prétraitement de ces rejets est nécessaire pour transformer ces composés moins biodégradables en composés de faibles poids moléculaires où les nutriments sont plus accessibles et plus stables (Yezza *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2009). L'utilisation de nombreuses méthodes telles que l'hydrolyse neutre, alcaline ou thermique permet d'améliorer la rhéologie des rejets et des diètes, ainsi que la disponibilité des nutriments pour une bonne assimilation des larves de *Cydia pomonella*.

Les conditions optimales de l'hydrolyse simple et thermique (à pH initial, neutre et alcalin) de faibles volumes de rejets (eaux usées et boues) sont effectuées dans un digesteur à micro-onde du système de Perkin Elmer et Paar Physica (E-U).

L'amélioration de la performance de ce procédé est due à un meilleur transfert d'oxygène résultant d'une diminution de la viscosité des milieux et d'une plus grande disponibilité des éléments nutritifs en raison de la solubilisation et de la biodégradabilité des boues (Verma *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2010). Ainsi, la solubilisation des nutriments dans les rejets hydrolysés va améliorer l'assimilation, par les larves, des diètes composées de ces rejets.

Hydrolyse thermique

Le principal paramètre du traitement thermique est la température suivi du temps de traitement qui varie entre 30-60 min (Climent *et al.*, 2007; Bougrier *et al.*, 2007). Les températures de traitement les plus courantes sont entre 60 et 180°C. Les traitements appliqués à des températures inférieures à 100°C sont considérés comme traitement thermique à faible température. Les températures de plus de 200°C ont été trouvées responsables de la formation des composés réfractaires liés à des réactions de Maillard où intermédiaires toxiques (Neyens et Bayens, 2003; Wilson et Novak, 2009).

L'hydrolyse effectuée à des températures élevées entraîne la minéralisation des éléments organiques en CO₂, H₂O et en éléments inorganiques par des réactions d'oxydation et de gazéification (Schieder *et al.*, 2000; Shanableh et Jomaa, 2001). Les protéines ou les polyamines sont transformées en peptides, amines, acides aminés, ammoniacque, nitrite et nitrate (Miron *et al.*, 2000).

Le procédé thermique le plus courant est l'injection directe de vapeur à des températures et pressions élevées. Récemment, le traitement aux micro-ondes (MO) qui est un rayonnement électromagnétique ayant une fréquence d'oscillation de 0,3 à 300 GHz, est considéré comme une méthode alternative à un prétraitement thermique classique pour économiser l'énergie. Les principaux avantages du chauffage à micro-ondes sont l'uniformité de chauffage et le contrôle précis de la température de traitement (Eskicioglu *et al.*, 2006; Toreci *et al.*, 2009).

L'hydrolyse thermique est souvent utilisée pour améliorer l'efficacité d'un processus de dégradation biologique subséquente comme la réduction du volume des boues et l'augmentation de la production de biogaz lors de la digestion anaérobie ou encore pour le recyclage des éléments utiles comme l'azote et le phosphore lors du traitement des eaux

usées. L'hydrolyse thermique améliore la déshydratation des boues et la réduction des pathogènes (Chu *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2005).

L'hydrolyse thermique cause la destruction des floes, la perturbation des cellules et la dépolymérisation des biopolymères. Elle entraîne une solubilisation et une hydrolyse importante des composants. Pour ces raisons, ce prétraitement a été appliqué afin d'accroître leur biodégradabilité lors de leur traitement aérobie et anaérobie (Li et Noike, 1992; Chu *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2005; Salsabil *et al.*, 2010). Les travaux récents sur l'amélioration de la dégradation biologique des boues d'épuration avec prétraitement thermique, sont présentés dans le Tableau 1.6.

Tableau 1.6: Processus des prétraitements d'hydrolyse thermique

Type de chauffage	Température (°C)	Temps (min)	Résultats	Références
Autoclave	165		18 % de la solubilisation de la DCO, 15 % de la solubilisation des MV; augmentation de la biodégradabilité de 47 à 61 % lors de la production de méthane.	Mottet <i>et al.</i> , 2009
Moufle	220		Caramélisation des hydrates de carbone.	Wilson et Novak, 2009
Micro-onde de 3,75 °C/min d'intensité	175		Plus de 83 % de la production de biogaz quotidien et 93 % la production de biogaz par quantité des MV ajoutée lors d'une digestion anaérobie d'une (temps de rétention des boues ou TRB de 5 jours) que du contrôle (TRB de 20 jours).	Toreci <i>et al.</i> , 2009
Micro-ondes à 2450 MHz et 700W		15	Augmentation du degré de solubilisation de 2% à 22%; augmentation du potentiel acidogène biochimique de 3,58 à 4,77 g de DCO par litre.	Ahn <i>et al.</i> , 2009
Micro-ondes	134	90	914% d'accroissement maximal du ratio de matières volatiles filtrables à matières volatiles totales (MVf / MVT).	Climent <i>et al.</i> , 2007
	70	540	0,52 de production maximale de biogaz	
Autoclave	190		Amélioration de la dégradation des lipides de 84% (67 % pour le contrôle), des hydrates de carbone de 82 % (56 % pour le contrôle), des protéines de 46 % (35 % pour le contrôle); augmentation de 25 % de production de méthane	Bougrier <i>et al.</i> , 2007
Autoclave	96		361% de DCO soluble et 475 % de production de biogaz cumulatif plus élevés que le contrôle	Eskicioglu <i>et al.</i> , 2006
Micro-ondes	96		143% de DCO soluble et 211 % de production de biogaz cumulatif plus élevés que le contrôle	

Hydrolyse alcaline et thermo-alcaline

Le traitement alcalin cause une destruction de la structure des floccs et de la paroi des cellules contenus dans les boues par des anions hydroxydes. En plus des réactions d'hydrolyses, un pH élevé des boues peut provoquer la désorption des polymères extracellulaires (PEC) par répulsion électrostatique suite à l'augmentation de la charge négative à la surface des particules organiques (Katsiris *et al.*, 1987; Barnabé, 2004). Ce pH élevé dénature les protéines des PEC, provoque la saponification des lipides et l'hydrolyse des acides ribonucléiques (la solubilisation de la membrane). Le traitement alcalin permet la solubilisation efficace des protéines (Penaud *et al.*, 1999; Aravinthan *et al.*, 2001). À un pH très élevé, les cellules

bactériennes ne supportent pas la pression osmotique et sont brisées. Le bris des cellules libère le matériel intracellulaire de la cellule (Neyens *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009). La dégradation chimique et l'ionisation des groupes hydroxyles ($\text{-OH} \rightarrow \text{-O-}$) induisent un gonflement des particules organiques qui rend les substances cellulaires plus sensibles aux attaques enzymatiques (Neyens *et al.*, 2004; Vlyssides et Karlis, 2004). Ainsi, le traitement alcalin peut perturber les floes et les cellules des boues, libérer les matières organiques intérieures, accélérer l'hydrolyse des boues et par conséquent améliorer significativement la biodégradabilité de la phase solide (Li *et al.*, 2008).

Certains métaux comme le cuivre et le molybdate sont solubilisés à pH très alcalin (Rajan *et al.*, 1989; McBride, 1998). L'efficacité du prétraitement des eaux usées et des boues par l'hydrolyse alcaline peut être améliorée par l'augmentation de la température (Tanaka *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003; Vlysside et Karlis, 2004). Le temps de réaction, la température, la concentration en solides, la dose de l'agent alcalin sont des facteurs influençant la solubilisation et la biodégradabilité des boues lors de l'hydrolyse alcaline (Lin *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2008; Doğan *et al.*, 2009). L'efficacité du NaOH comme agent alcalin a été confirmée pour l'hydrolyse par rapport au KOH et au Mg(OH)_2 qui permettent d'obtenir des rendement moins intéressant (Penaud *et al.*, 1999). De plus, NaOH est un produit peu coûteux et très populaire (Rajan *et al.*, 1989). Les travaux sur les prétraitements alcalin et thermo-alcalin pour l'amélioration de la biodégradation des boues sont présentés dans le Tableau 1.7.

Tableau 1.7: Traitements alcalin et thermo-alcalin des boues

Agent alcalin	pH	Temps	Combinaison	Résultats	Références
100 g NaOH/kg MES		30	Ultrasonification (7500 kJ/kg MS d'énergie spécifique)	Augmentation de 275 mg/ L DCO _s (contrôle) à 6797 mg/L; augmentation de 38,0% à 50,7% de la dégradation de la matière organique dans la digestion aérobie	Jin <i>et al.</i> , 2009
	12		micro-ondes (160 ° C)	Augmentation du ratio DCO _s / DCO _T de 0,005 (contrôle) à 0,34; amélioration de 16,3 % de production de gaz total et 18,9% de méthane dans le réacteur anaérobie à petite échelle; amélioration de la réduction des ST, MV, et DCO _T de 24,9 %; 35,4% et 30,3% respectivement dans un réacteur anaérobie semi-continu de 2 L en 92 jours	Doğan et Sanin, 2009
	10,25	45	Hydrolyse (121 ° C)	Amélioration de la biodégradabilité des boues en termes de la consommation de ST lors de la dégradation aérobie de 44,5% par rapport au contrôle de 26,5 %	Verma <i>et al.</i> , 2007
7 g NaOH/L		30	Hydrolyse (121 ° C)	Amélioration de la réduction de la DCO _T de 73,7% et MV de 57%; augmentation de 0.45m ³ /kg MV de rendement en méthane et de 10,9% du contenu en méthane du biogaz issu de la digestion anaérobie	Park <i>et al.</i> , 2005
	11		Hydrolyse (90 ° C)	Réduction des MVES initiales de 46% et production de méthane de 0,28 L CH ₄ /kg MVES initiale	Vlyssides et Karlis, 2004
40meq/L NaOH				Augmentation du ratio DCO _s /DCO _T de 3,5 à 55%; amélioration de la réduction de la DCO de 30 % et de la production de biogaz de 34 %, récupération de 94 % du carbone et 105 % de l'azote, production en méthane de 349ml pour chaque gramme de DCO éliminé	Lin <i>et al.</i> , 1999

1.4.2 Lyophilisation

La lyophilisation consiste à faire évaporer l'eau à basse température (de -40 °C à -20 °C) congelant l'aliment dans un premier temps, puis en sublimant (de -20 °C à 0 °C) la glace (sous vide) et enfin en produisant de la chaleur (de 4 °C à 20 °C) par un transfert d'énergie, ne laissant qu'un aliment sec, poreux, de grande qualité, avec un fort potentiel de réhydratation (Roux, 1994; Recchias, 2010). Ce procédé, aussi appelée séchage à froid, consiste à retirer l'eau d'un aliment afin de le rendre stable à la température ambiante et de faciliter sa conservation. Cette méthode préserve la qualité et la conservation de la concentration totale des nutriments présents en limitant les risques de contamination (Roux, 1994) des aliments. Le temps de séchage réduit apporté par la lyophilisation, diminue le coût d'énergie par rapport aux autres procédés de séchage comme le séchage au four à dessiccation qui utilise plus d'énergie, car c'est un processus de séchage très long.

Les industries alimentaires et pharmaceutiques sont les principaux utilisateurs de la lyophilisation (Roux, 1994). Ce procédé est utilisé pour des aliments où des produits ne supportant pas la chaleur (médicaments,...) où pour des aliments qui exigent une rapide réhydratation (ail, café instantané, chocolat en poudre, fines herbes, soupes et jus en poudre). La lyophilisation des rejets agro-industriels est un processus qui permet la conservation des facteurs organoleptiques, la structure et la composition physique des diètes sur plusieurs années par rapport à d'autres techniques de séchage qui sont moins efficaces (Roux, 1994).

1.4.3 Modification des caractères physiques des boues

La taille des particules et la rhéologie sont des propriétés physiques importantes des boues et des eaux usées très concentrées qui peuvent influencer le transfert de l'oxygène et des éléments nutritifs lors de la bioconversion. Ces éléments peuvent également influencer l'activités enzymatiques (Brar *et al.*, 2007; Drouin *et al.*, 2007) des larves.

La viscosité élevée et la grande taille des particules de ces rejets sont principalement causées par la présence des polymères extracellulaires (PEC) qui sont responsables des amas dans les boues. Le prétraitement d'hydrolyse permet de briser les floccs et de diminuer la viscosité des boues. Ce qui améliore la diffusion de l'oxygène.

L'hydrolyse peut aussi modifier la complexité rhéologique des boues d'épuration afin de faciliter la bio-production de produits à valeur ajoutée (Brar *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007). L'hydrolyse alcaline thermique diminue le comportement non-newtonien des boues et des eaux usées (indiqué par la non-linéarité de la relation entre le taux de cisaillement et le stress de cisaillement). Car un comportement non-newtonien important (appelé viscoélasticité) est le fait que la réponse du fluide à une déformation présente à la fois un aspect visqueux (où les contraintes sont proportionnelles aux vitesses de déformation) et un aspect élastique (où les contraintes sont proportionnelles aux déformations). Ceci permet d'améliorer l'assimilation des nutriments présents dans la diète par le carpocapse de pomme (CP). De plus, l'hydrolyse diminue la pseudo plasticité (la viscosité diminue avec le taux de cisaillement) des rejets et des diètes en augmentant l'indice de comportement de l'écoulement et en baissant l'indice de consistance du modèle « Power law » qui a été démontré prééminent dans la description de la rhéologie des boues et des eaux usées concentrées (Ha *et al.*, 2010; Benlismane *et al.*, 2011). Cela améliore le transfert de masse et de chaleur, ainsi que la fluidité des rejets pour la bio-production et le transport à travers la chaîne de traitement. Ce prétraitement influence favorablement les activités enzymatiques et métaboliques en réduisant la matière solide (organique et inorganique) sous forme liquide (minérale). Ceci facilite le traitement biologique et la réutilisation des boues et des eaux usées en produits à valeur ajoutée (PVA).

1.5 Paramètres d'élevage des insectes

La connaissance des facteurs environnementaux présents au Tableau 1.8 est importante afin de mieux maîtriser leur impact sur la formulation des diètes alternatives et le processus d'élevage du Carpocapse de pomme (CP) (Figure 1.5).

Tableau 1.8: Paramètres environnementaux nécessaires pour l'élevage du CP

Paramètres	Définition	fonctions	valeurs	Auteurs
pH	Détermine l'acidité ou l'alcalinité de la diète	Influence la saveur, l'oxydation, la détérioration hydrolytique et la solubilité des nutriments	Transite des insectes: 9-10 ± 0.1 . Diète: 6.3- 6.7 ± 0.1	Cohen, 1998; Cohen, 2004
Photopériode	L'alternance régulière des jours et des nuits et la variation de leur durée au cours des saisons	déclenche chez les insectes, le photopériodisme, influence la croissance, l'étape postembryonnaire des insectes	Pour les insectes : 16:8 ou 18:6h	Setyobud, 1990; Welty, 1992
Température	Détermine le chaud et le froid de la diète et d'un milieu	Important pour le métabolisme des insectes; éviter la croissance microbienne	Diète: 25-46°C Préparée : 70-80°C; Insecte : 15-25°C	Gao <i>et al.</i> 2000; Saethre et Hofvang, 2002;
L'humidité	Concerne l'eau, la vapeur d'eau ou le liquide renfermé par la diète	Influence la solidité et la contamination des diètes; favorise le développement des insectes	La zone d'élevage doit se situer entre 40 et 70%	Rafoss et Saethre, 2003

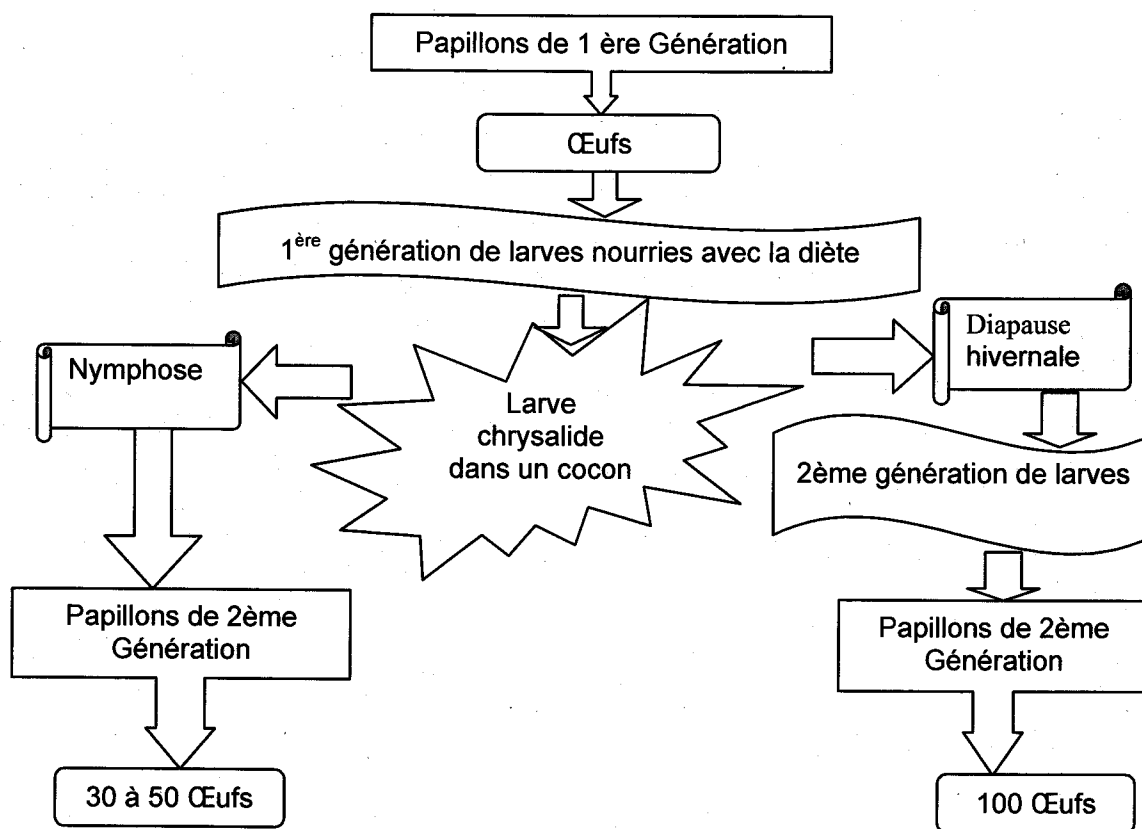


Figure 1.5: Schéma de l'élevage du carpocapse de pomme à l'échelle industrielle

1.6 Activité enzymatique chez les insectes

Les enzymes sont des substances protéiques naturellement produites par tous les organismes vivants; Chacune étant très spécifiques à une réaction chimique.

De nombreux travaux ont eu pour objet l'identification des enzymes digestives et la détermination de la structure fine du tube digestif chez des insectes, compte tenu de l'importance économique de la nourriture et du régime alimentaire différent (Terra, 1994). Chez *Podisus maculiventris*, les recherches ont montré que les activités enzymatiques du tube digestif augmentent progressivement lorsque les larves atteignent le dernier stade. De plus, le profil enzymatique des insectes adultes en générale, ressemble à celui des larves du 5^{ème} stade et est presque identique pour les deux sexes (Stamopoulos *et al.*, 1993).

Les enzymes digestives des insectes sont, en générale, fonction de la nature de leur nourriture (Moyano *et al.*, 1996). Les insectes phytophages comme *Cydia pomonella* ont besoin d'enzymes (Amylase, protéase, lipase, maltase et invertase) pour digérer tous les aliments qu'ils consomment durant leur développement. La digestion chez l'insecte est un processus complexe qui se produit dans l'appareil digestif où les aliments consommés sont brisés en minuscules fragments par les enzymes. Cette étude a porté sur l'activité enzymatique des protéases, des lipases et des amylases qui ont permis la digestion des nutriments (protéines, glucides et lipides) retrouvés dans les aliments de la plupart des insectes et indispensable au bon fonctionnement de leur organisme.

Le tube digestif des larves d'insectes phytophages possède une structure relativement simple constituée d'un tube reliant la bouche à l'anus et bordé d'une couche monocellulaire de cellules formant un épithélium se divise en trois parties distinctes (Figure 1.6) :

(1) Une membrane péritrophique qui délimite deux zones du tube digestif médian (l'espace endopéritrophique et l'espace ectopéritrophique). Cette membrane est constituée d'un entrelaqué de fibrilles de chitine pris dans une matrice de glycoprotéine. Celle-ci est issue de la condensation de sécrétions de l'épithélium du tube digestif médian. La membrane péritrophique assure une protection mécanique de la bordure en brosse (prévention de l'attachement non spécifique de matériel non digéré sur les hydrolases et/ou les transporteurs membranaires) qui constituent une barrière physique contre les microorganismes et représente un tamis moléculaire grâce à sa propriété semi-perméable (Terra, 1994). Ses fonctions sont similaires à

celle du mucus gastro-intestinal des mammifères et ses glycoprotéines constitutives possèdent des homologies avec les mucines du tube digestif des mammifères.

(2) Un épithélium constitué majoritairement de cellules dites colonnaires. Ces cellules sont pourvues à leur surface de microvillosités formant la « bordure en brosse ». Cet épithélium est présent sur toute la longueur du tube digestif médian. La localisation des enzymes présents au sein de l'intestin moyen, compte tenu de son organisation structurale, permet de mettre en évidence les deux caractéristiques essentielles de la digestion chez les insectes phytophages holométaboles: la digestion est séquentielle et compartimentée (Figure 1.6a et b). Les endoprotéases sont sécrétées par les cellules de l'épithélium, puis libérées dans l'espace endopéritrophique où elles initient les premières étapes de la digestion des protéines. Les peptides, issus de cette première dégradation, passent dans l'espace ectopéritrophique où les exopeptidases (souvent liées à la surface de l'endothélium) achèvent la digestion en libérant les acides aminés.

L'existence d'un courant d'eau dans l'espace ectopéritrophique, progressant en sens inverse (postérieur-antérieur) du bol alimentaire situé dans l'espace endopéritrophique (antérieur-postérieur), permet une recirculation des protéases (Figure 1.6b). Les protéases de l'espace endopéritrophique passent dans l'espace ectopéritrophique au niveau de la partie postérieure et remontent vers la partie antérieure de l'intestin, puis entrent à nouveau dans l'espace endopéritrophique (Figure 1.6b). Le flux d'eau ainsi créé permet de récupérer par simple effet de diffusion toutes les molécules présentes dans l'espace endopéritrophique et suffisamment petites pour passer à travers les pores de cette membrane ($\leq 8\text{nm}$). Chaque enzyme peut donc effectuer plusieurs passages dans l'espace endopéritrophique.

(3) L'intestin moyen est le site majeur de la digestion des protéines et des glucides chez les lépidoptères et les coléoptères. Les protéases et les amylases seraient sécrétées par les cellules de l'intestin moyen puis traverseraient l'espace ectopéritrophique afin d'atteindre la lumière de l'intestin antérieur (Terra, 1994). Les insectes utilisant des protéases à sérine (lépidoptères, orthoptères et crabes) ont un pH intestinal basique (8-11), alors que les coléoptères qui utilisent des protéases à cystéine présentent un pH intestinal légèrement acide.

Le Carpocapse de pomme, *Cydia pomonella* a été choisi pour l'étude de l'activité enzymatique des insectes, compte tenu de sa disponibilité. Ainsi, la littérature sur les insectes a fourni les informations suivantes:

- La salive des lépidoptères a un pH neutre ou alcaline qui change l'amidon en glucose.
- Les intestins antérieurs qui ne sécrètent pas de liquides digestifs présentent un pH neutre, alcalin et acide selon la nourriture consommée.
- Le colon gastrique sécrète un suc qui digère les protéines et les glucides. À l'intérieur de l'intestin, les protéines sont digérées et les graisses émulsionnées.

1.6.1 Protéases

Cette enzyme hydrolyse les protéines en peptides et en acides aminés (aa). Les protéases ont comme principale fonction, l'hydrolyse des liens peptidiques. Les protéines sont constituées de 20 aa. Chaque protéase agit sur un aa spécifique. La protéase est présente dans le tube gastrique et dans l'intestin de l'insecte.

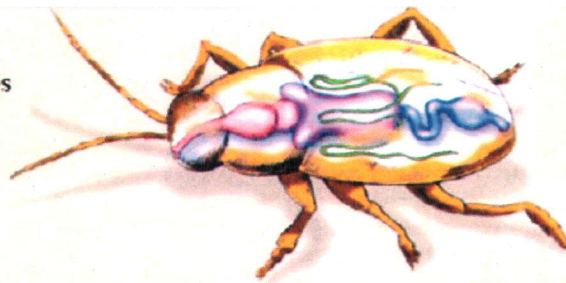
1.6.2 Amylases

Cette enzyme dégrade les glucides qui comprennent les principaux sucres (saccharose, lactose et fructose). Les amylases constituent un groupe d'hydrolases qui scindent les glucides complexes des unités alpha-D-glucose liées par des atomes de carbone 1 et 4 situés sur des résidus de glucose adjacents. L'amylase est présente dans l'intestin antérieur, le tube gastrique et l'intestin intérieur.

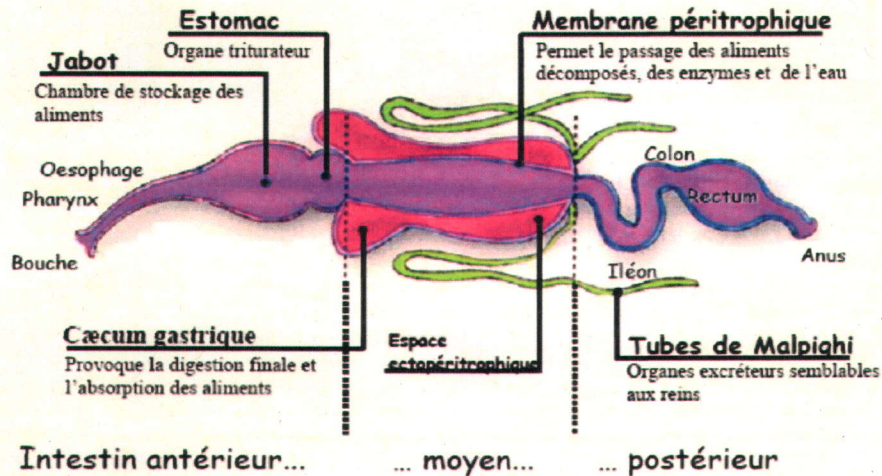
1.6.3 Lipases

Les lipases dégradent les graisses (lipides) qui comprennent les graisses et les huiles, les phospholipides (la lécithine) et les stérols (cholestérols). Cette enzyme est uniquement présente dans les glandes salivaires de l'insecte.

Le parcours et les transformations des aliments



a.

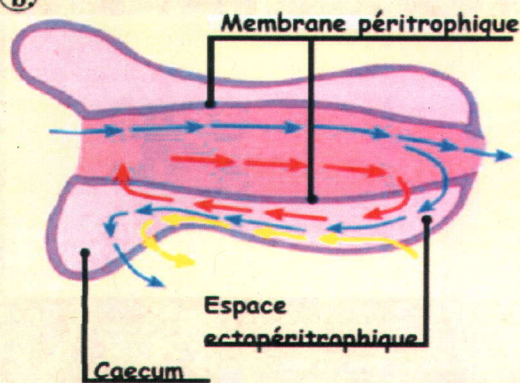


Après la mastication, l'aliment traverse l'**intestin antérieur** (recouvert de chitine et imperméable à la plupart des substances)

L'**intestin moyen** est le lieu où se déroule la production des enzymes, la plus grande partie de la digestion et de l'absorption des nutriments. L'aliment est attaqué par les enzymes et fractionné au niveau de la membrane péritrophique. Ensuite, les particules digérées traversent cette membrane et atteignent par un système de circulation les cellules qui absorbent les nutriments.

L'**intestin postérieur** intervient dans l'élimination des déchets, et dans l'équilibre de l'eau et des sels minéraux

b.



Le recyclage des enzymes.

Les enzymes (flèche rouge) traversent la membrane péritrophique et arrivent dans l'espace ectopéritrophique accompagnant les aliments (flèche bleue) au fur et à mesure qu'ils sont fractionnés. Les enzymes retraversent ensuite la membrane, au niveau de la première partie de l'intestin moyen. L'eau (flèche jaune) passe par l'espace ectopéritrophique jusqu'au caecum dans lequel elle est absorbée.

Figure 1.6: Représentation schématique de l'organisation du tube digestif des coléoptères et lépidoptères phytophages (Source modifiée : Terra, 1994).

a. Schéma de l'organisation du tube digestif.

b. Diagramme des flux aqueux et de la circulation des enzymes digestives.

Partie 2 PROBLÉMATIQUES

2.1 Production de la diète d'insecte à partir des eaux usées et des boues

La bibliographie sur la diète conventionnelle, le carpocapse de pomme (CP), la formulation du *baculovirus* à partir des granulovirus obtenus après l'élevage et les rejets agroindustriels informent sur le coût de la production et les difficultés rencontrées lors de la production de cette diète. Le but de cette étude est de produire une diète alternative utilisée pour l'élevage du CP à partir des eaux usées et des boues agroindustrielles. Les tests d'infection par le granulovirus des larves du CP élevées sur cette diète permettront de produire un bioinsecticide viral, le *baculovirus*, pour protéger les vergers et les forêts contre le CP (*C. pomonella*). À cet effet, les problèmes ressortis dans cette étude sont discutés ci-dessous.

2.1.1 Problématique du coût de production de la Diète

Le coût élevé des biopesticides est la raison majeure qui pousse les agriculteurs à toujours utiliser les pesticides chimiques qui sont dangereux pour l'environnement et la santé humaine.

Le contrôle biologique par les *granulovirus* (*Baculovirus*) s'est avéré le plus optimal pour la lutte contre le CP (Brar et al., 2008) et la plus sécuritaire pour l'environnement et la santé humaine (Reuveny et Cohen, 2007). Ce bioinsecticide est produit en infectant, par des *granulovirus*, des larves de carpocapse de pomme élevées sur des diètes spécifiques. Malheureusement, le coût de la diète est exorbitant à cause du prix élevé de ses ingrédients (farine sojas, levure, germe de blé, vitamines, sels minéraux et agents antimicrobiens) qui constituent 35% du coût de sa formulation. La diète influence énormément celui du *Baculovirus*, car dans la plupart des procédés de production, 40% du coût des biopesticides est supporté par la diète, à cause de son coût d'importation (110\$/Kg de poudre de diète pour produire 3500 L virus/an) qui est trop élevé pour la compagnie BioTepp du Canada (Brar et al., 2008). Ce schéma typique qui est celui de toutes les compagnies spécialisées dans la production de biopesticide à partir des diètes, suscite le besoin de trouver un substrat plus économique alternatif aux ingrédients conventionnel de la diète.

Face à ces difficultés, les chercheurs et les industriels utilisent des milieux alternatifs (déchets de maïs, le lactosérum, les résidus brassicoles de levure, les farines de poisson, etc) comme

agents nutritifs pour la production de la diète et des biopesticides (Sachveda *et al.*, 1999; Zouari et Jaoua, 1999; Saksinchai *et al.*, 2001). Ces substrats peu coûteux et très riches en nutriments sont restreints à l'échelle locale et nécessitent des frais de transport exorbitants qui dissuadent les pays pauvres (Tirado *et al.*, 1998; Vidyarthi *et al.*, 2002). Aussi, l'utilisation des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration municipales, riches en nutriments (Brar *et al.*, 2006; Vu *et al.*, 2009), comme agents nutritifs alternatifs à certains ingrédients (la farine de soya, les germes de blé et la levure de bière diète) pour la production d'une diète économique peut résoudre le problème du coût.

Par ce procédé de biotransformation, le projet Diète-Baculovirus-INRS apporterait des solutions aux problèmes complexes du coût de la diète et si possible de la gestion des eaux usées et des boues d'épuration.

2.1.2 Disposition et traitement des eaux usées agroindustrielles et des boues afin d'augmenter la solubilisation des nutriments et l'assimilation des diètes

Les eaux usées et les boues d'épuration constituent un problème de disposition dans l'environnement, car elles représentent une source de contamination, et les coûts des procédés de traitements (digestion, incinération, recyclage...) sont élevés pour les diverses industries.

L'utilisation des eaux usées concentrées et des boues d'épuration pour la production des diètes est un processus utile pour l'environnement et la société. Néanmoins, ces rejets ne sont pas propices à une réutilisation directe pour la production des diètes. Ces rejets étant des matières complexes pour la production des diètes, nécessitent un prétraitement pour transformer les composés moins biodégradables en nutriments biodisponibles et plus facilement accessibles (Yezza *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2007) pour la production des produits à valeurs ajoutés (PVA). L'hydrolyse simple, alcaline, thermique, thermo-alcaline et la lyophilisation permettent la biodisponibilité des nutriments, la stabilisation et la conservation des rejets pendant longtemps (1 an ou plus). Ce procédé est susceptible de fournir d'excellentes diètes à base de rejets propices à la croissance des larves du carpocapse. Les conditions optimales de l'hydrolyse simple, alcaline, thermique et thermo-alcaline établies par Barnabé (2009) et Yezza *et al.* (2005) dans les eaux usées et les boues municipales sont utilisées pour le traitement des rejets des eaux usées de microbrasserie (EMB) et des boues d'industries de jus de pomme (POM) utilisées pour la production des diètes.

*Par conséquent, une question est soulevée: «L'application de l'hydrolyse et de la lyophilisation des rejets améliore-t-elle la biodisponibilité des nutriments et les propriétés physiques (rhéologie et taille des particules) des diètes pour l'obtention d'une meilleure croissance du carpocapse de pomme *C. pomonella*?*

L'obtention d'un meilleur élevage des larves peut être attribuée à une faible viscosité des diètes et une disponibilité élevée des nutriments en raison de la solubilisation et de la biodégradabilité des rejets.

2.1.3 Évaluation de l'activité enzymatique des larves du carpocapse de pomme élevées sur les diètes relativement à la teneur des nutriments assimilés.

La concentration en solides totaux (ST) des rejets agroindustriels de POM (46 à 69 g/L) et des EMB (66 à 86 g/L) est moins élevée que celle en ST (106 à 129 g/L) de la diète standard produite avec les composants semi-synthétiques (farine de soja-FS, germe de blé-GB et extrait de levure-EL) et synthétiques (sels minéraux, antimicrobiens et sucrose) et des ST (123 à 219 g/L) des diètes alternatives composées des rejets et des composants standards.

L'évaluation de l'activité enzymatique chez les larves de *Cydia pomonella* à travers une étude du bilan de masse a permis de déterminer l'influence de la quantité et de la qualité des nutriments assimilées par les larves élevées sur les diètes alternatives.

«Est-il possible d'établir les relations entre le taux d'enzymes présents dans les larves cultivées sur chaque diète et les concentrations en nutriments assimilés dans ces diètes et dans les rejets selon les traitements effectués»?

Une bonne activité enzymatique favorable à une bonne assimilation des diètes peut favoriser l'assimilation du baculovirus pour l'infection des larves.

Partie 3 HYPOTHÈSES – OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

3.1 Hypothèse de recherche

Selon les problématiques spécifiques de cette étude et en tenant compte de la revue de littérature, les hypothèses de recherche suivantes ont été formulées:

- ❖ **Hypothèse 1 :** L'utilisation des rejets agroindustriels (eaux usées de microbrasserie, lesboues d'industrie de jus de pomme et les eaux usées d'amidon) et des boues d'épuration municipales comme agents nutritifs alternatifs à certains ingrédients standards (la farine de soya, les germes de blé et la levure de bière) pour la production d'une diète économique pourrait résoudre le problème du coût de la diète et de la disposition des rejets.
- ❖ **Hypothèse 2 :** L'hydrolyse simple, alcaline, thermique et thermo-alcaline améliorerait labiodégradabilité, la solubilisation de la matière organique et la biodisponibilité des nutriments dans les rejets agroindustriels (EMB et POM). Ces rejets sélectionnés comme les meilleurs agents nutritifs, après caractérisation et optimisation (méthodologie de la réponse en surface), pourraient remplacer certains composants de la diète standard. Le prétraitement des rejets pourrait augmenter la biodisponibilité des nutriments et améliorer les propriétés physiques (réduction de la viscosité et de la taille des particules) des diètes à base de ces rejets. Ce qui pourrait améliorer le pourcentage d'élevage du CP sur ces diètes faciles à digérer par les larves.
- ❖ **Hypothèse 3 :** L'amélioration de l'activité des enzymes digestifs des larves de *C.pomonella* par l'utilisation des rejets prétraités pourrait favoriser l'assimilation et la digestion des aliments par les larves en vue de promouvoir l'élevage du CP. Ceci permettrait d'évaluer le bilan de masse des nutriments assimilés par les larves. Car une bonne activité des enzymes digestifs, en augmentant l'assimilation et la digestion des diètes, pourrait accroître l'assimilation du granulovirus pour l'infection des larves.

3.1.1 Justification des hypothèses

❖ **Hypothèses 1 :** L'utilisation d'un substrat (eaux usées et boues agroindustrielles et municipales) comme agents nutritifs pour la production d'une diète économique et efficace. Ce substrat devrait fournir un rendement d'élevage proche de celui de la diète standard fourni par la compagnie de BioTepp.

❖ **Hypothèses 2:** Les processus de prétraitement d'hydrolyse et de lyophilisation amélioreraient l'élevage du CP des diètes à base des rejets (EMB et POM).

➤ **Hypothèse 2.1:** Car, L'hydrolyse augmenterait la biodisponibilité des nutriments (protéines, glucides, lipides et minéraux), la solubilisation de la matière organique et inorganique et la biodégradabilité des rejets (réduction des ST, des MES, de la viscosité et de la taille des particules). Ceci tend à augmenter la biodisponibilité des nutriments et améliorer les propriétés physiques des diètes à base de rejets.

➤ **Hypothèse 2.2:** Les traitements diminuant la taille des particules et la viscosité des rejets faciliteraient le transfert de l'oxygène et la biodisponibilité des nutriments pour les larves dans les diètes.

➤ **Hypothèse 2.3:** L'hydrolyse (simple, alcaline, thermique et thermo-alcaline) pourrait accroître le rendement du Carpocapse (taux d'éclosions, taux de croissance de larves, taux de croissance des chrysalides et taux de croissance des papillons) en améliorant l'assimilation des diètes à base des rejets (POM et EMB). Ce prétraitement améliorerait les caractéristiques (pH, humidité, viscosité et taille des particules) des diètes alternatives.

❖ **Hypothèses 3:** La qualité et la quantité d'enzymes digestifs des larves obtenues influenceraient l'assimilation des nutriments des diètes à base de rejets hydrolysés ou non.

➤ **Hypothèse 3.1:** Car, les diètes à base de rejets hydrolysés peuvent augmenter la production des enzymes (protéase, amylase et lipase) des larves élevées sur ces diètes. Le prétraitement favoriserait la digestion et l'assimilation des diètes par la production élevée des enzymes.

➤ **Hypothèse 3.2:** L'analyse des enzymes permettra de confirmer le bilan de masse des nutriments assimilés. Car cette analyse permettrait de définir, pour chaque enzyme, le nutriment qui a été digéré et assimilé.

3.2 Objectifs et méthodologies

3.2.1 Objectif général

Développer une diète économique à partir des milieux résiduels (eaux usées et boues d'épuration) pour l'élevage du Carpacse de pomme en vue de produire un bioinsecticide viral (*Baculovirus*).

3.2.2 Objectifs spécifiques

Objectif 1

Production d'une diète économique en utilisant les eaux usées agroindustrielles et les boues municipales comme agents nutritifs alternatifs à certains ingrédients standards (Farine de soja, germe de blé et extrait de levure) afin de rentabiliser l'élevage du CP.

Objectif 2

Traiter les eaux usées agroindustrielles (eaux usées de microbrasserie-EMB et des boues d'industrie de jus pomme-POM) par le processus d'hydrolyse (simple, alcalin, thermique et thermo-alcaline) afin d'augmenter la biodisponibilité des nutriments et de réduire les propriétés physiques des diètes alternatives.

Objectif 3

Détermination des enzymes digestifs des larves afin d'évaluer les meilleures diètes par l'assimilation des nutriments par les larves.

3.3 Plan expérimental

3.3.1 Schéma du plan expérimental de cette thèse

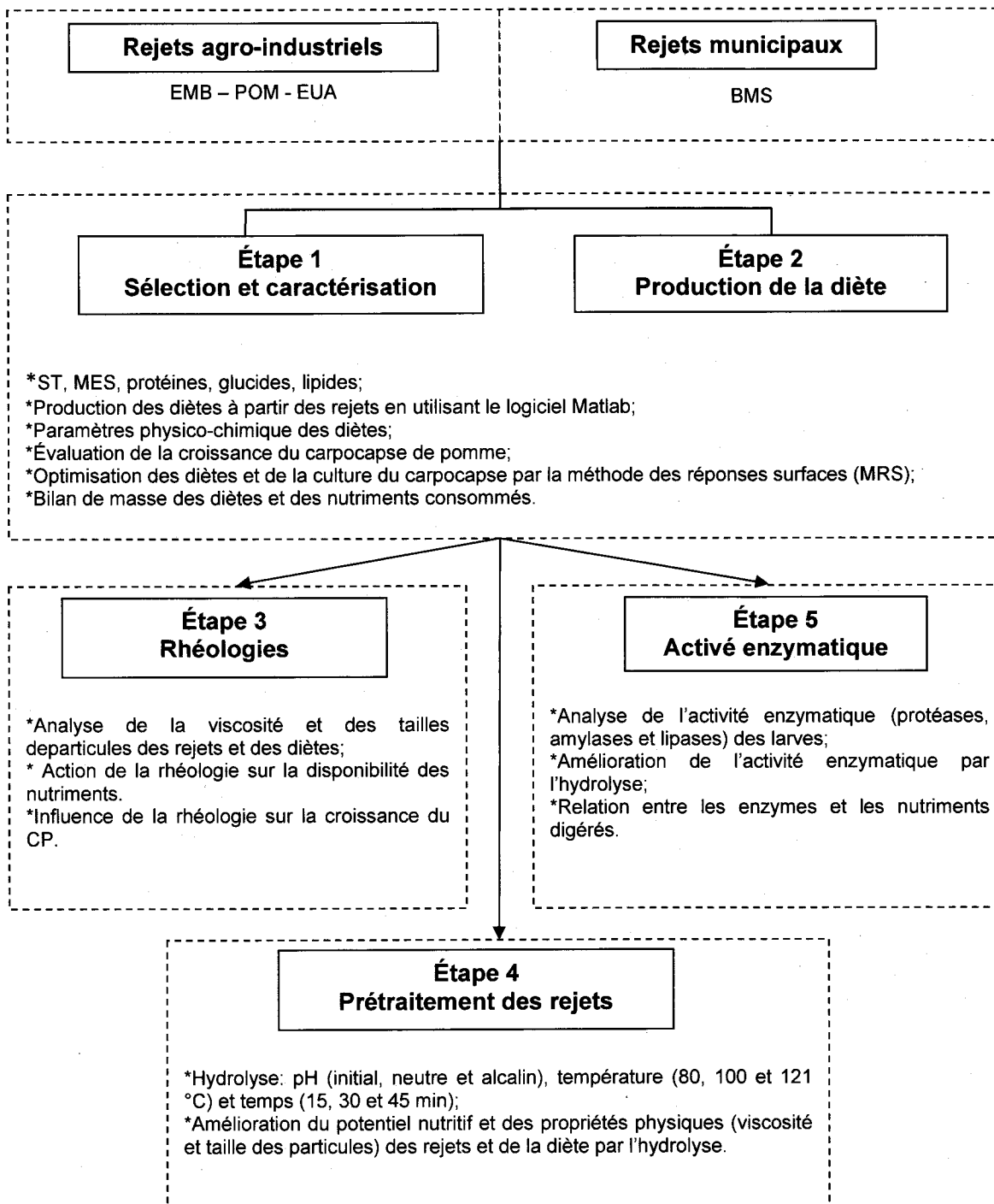


Figure 1.7: Schéma récapitulatif du plan expérimental

3.3.2 Démarche méthodologique

La méthodologie pour chacun des objectifs spécifiques est présentée dans les chapitres relatifs à ces objectifs sous formes d'étapes dans le schéma de la Figure 1.7. Le chapitre 2 porte sur les travaux de la caractérisation et la sélection des rejets (eaux usées et boues) agroindustriels et municipaux; le bilan de masse et les propriétés physiques des diètes produites à partir des eaux usées de microbrasserie (EMB) et des boues de pomme (POM); l'optimisation de la production de la diète à base des rejets et l'élevage du carpocapse de pomme (CP) par la méthodologie de la réponse en surface (MRS) (Objectifs 1, 2). Le chapitre 3 traite de l'optimisation des processus de prétraitement des rejets sélectionnés, l'influence du prétraitement d'hydrolyse sur le potentiel nutritif et les propriétés physiques (la viscosité et la taille des particules) des diètes et sur l'élevage du CP, (Objectif 3 et 4). Le chapitre 4 présente les travaux de l'effet de l'activité enzymatique sur la concentration nutritive des diètes et par conséquent sur la croissance des larves du CP (Objectifs 5).

Méthodologie 1

- 1) Analyse théorique des principaux nutriments des composants de la diète standard utilisée pour la croissance du carpocapse de pomme (CP);
- 2) Sélection et caractérisation des rejets (eaux usées et boues) agroindustriels et municipaux susceptibles de remplacer valablement les composants standards (farine de soja-FS, germe de blé-GB et extrait de levure-EL) sans affecter le potentiel nutritif et les propriétés physico-chimiques (pH, humidité, la viscosité et la taille des particules) de la diète standard;
- 3) Lyophilisation des rejets pour faciliter leur utilisation pour le remplacer des ingrédients standards (farines de soja, germe de blé et extrait de levure) durant la production des diètes et surtout conserver leur potentiel nutritif et leurs propriétés. Car sous forme de poudre sèche les rejets se mélangent facilement avec les autres composants en présence tout en réduisant les risques de contaminations avec la présence d'humidité. Les rejets se conservent plus longtemps;
- 4) Formulation de la diète alternative à partir des rejets sur la base de la concentration des nutriments (protéines, glucides et lipides) présents dans les rejets et dans la diète standard. Cette production tient compte aussi de la quantité des rejets à apporter et de la quantité des ingrédients standards (Farine de soya, germe de blé et extrait de levure) à remplacer. Ce remplacement se fera à l'aide du logiciel de calcul Matlab. Mesure du pH et de la perte d'humidité des diètes produites;

5) Élevages des œufs, des larves, des chrysalides et des adultes du CP sur les diètes alternatives en fonction des conditions d'élevages (photopériode, la température et le taux d'humidité) indispensable pour la bonne croissance;

6) Optimisation: Les conditions optimales des meilleurs diètes seront déterminées lors de l'élevage des larves de *Cydia pomonella*.

Planification des expériences de criblage, du plan composite centré (PCC) et des valeurs optimales par la méthodologie de la réponse de surface (MRS). Analyse des résultats est effectuée par le logiciel STATISTICA ANOVA pour déterminer les conditions optimales des meilleures reproductibilités et la signification statistique des résultats. La validation des conditions optimales pour définir, le meilleur rejet, le meilleur ingrédient et la meilleure diète alternative qui a fourni les meilleurs résultats d'élevage.

7) Évaluation de la quantité de nutriments (protéines, lipides et glucides) assimilée par les larves et qui a contribué à leur croissance à travers une étude du bilan de masse. L'influence de la capacité nutritive et des propriétés physiques des diètes produites à base de rejets sur l'élevage du CP est déterminée.

Méthodologie 2

1) Des expériences préliminaires sont réalisées en microonde pour déterminer les meilleurs traitements à appliquer aux rejets sélectionnés, parmi les techniques de traitement suggérés.

- Sélection des meilleurs traitements: Pour chacun des traitements d'hydrolyse, trois températures (80, 100 et 121 °C), trois temps (15, 30 et 45 minutes) et trois tests de pH (initial, neutre et alcalin) sont étudiés. Les meilleurs traitements sont évalués selon la concentration et la solubilisation des nutriments de la biodégradabilité des rejets et de la croissance des larves.
- Effets des traitements sur la composition des eaux usées et des boues d'épuration: L'influence des traitements sur les caractéristiques physico-chimiques (pH, MES, ST, protéines, lipides, glucides, minéraux, viscosité et la taille des particules) des eaux usées, des boues et des diètes est aussi étudié afin de déceler le ou les facteurs responsables de la diminution et/ou de l'augmentation de la croissance des larves.

2) Optimisation: les conditions optimales des meilleurs traitements sélectionnés seront déterminées en microondes.

- Planification des expériences: Une méthode statistique expérimentale est utilisée pour planifier les expériences d'optimisation de l'hydrolyse.
- Analyse des résultats: Les résultats sont analysés avec le logiciel STATISTICAT ANOVA pour déterminer les conditions optimales des meilleures reproductibilités et la signification statistique des résultats.
- Validation des conditions optimales: Les conditions traitements sont vérifiées lors des expériences d'hydrolyse et les expériences de cultures de larves. Une méthode statistique des traitements optimaux évalue les meilleurs résultats d'hydrolyse.

Methodologie 3

1) Mesure de la concentration des enzymes digestifs des larves élevées sur les diètes à base de rejets hydrolysés. Ces résultats ont permis de vérifier l'influence de l'hydrolyse sur l'augmentation de la production des enzymes (protéase, amylase et lipase). Ceci a permis aussi de comprendre comment le prétraitement a favorisé la digestion et l'assimilation des diètes par une activité enzymatique élevée des larves. Ce qui pourrait déterminer si la quantité d'enzyme produite influence la croissance des larves. Aussi, comment ces enzymes pourraient favoriser l'infection des larves par les granulovirus pour produire le *Baculovirus*.

2) L'Analyse des enzymes pourrait confirmer le bilan de masse des nutriments assimilés, en définissant pour chaque enzyme, le nutriment qui a été digéré et assimilé.

Partie 4 RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus durant ce projet de thèse sont présentés en trois parties.

La première partie décrit les résultats obtenus après la caractérisation et la sélection des rejets et surtout la caractérisation des diètes produites à partir des rejets sélectionnés. Cette partie traite aussi des résultats d'élevage du carpocapse de pomme (CP), obtenus, dans les conditions standard d'industrie (25 °C; 50% d'humidité et 16 h de photopériode) sur les diètes produites avec les rejets sélectionnés et jugés les plus favorables pour la culture. L'optimisation des paramètres physico-chimiques (viscosité, taille des particules, pH et humidité) des diètes a permis d'évaluer les paramètres d'élevage des insectes (taux d'éclosion, taux de croissance des larves, taux de croissance des chrysalides et des adultes) et de faire le bilan nutritif des aliments assimilés par les larves durant leur développement (3 manuscrits publiés et un manuscrit accepté).

La seconde partie concerne le prétraitement d'hydrolyse utilisé pour améliorer le potentiel nutritif (protéines, lipides, glucides et métaux) et les propriétés physiques (pH, humidité, viscosité et la taille des particules) des rejets sélectionnés (eaux usées de microbrasserie-EMB et les boues d'industrie de jus de pomme-POM) utilisés comme source de nutriments des diètes afin de rentabiliser l'élevage des larves de *Cydia pomonella* (1 manuscrit soumis).

La troisième partie présente les relations entre les enzymes (protéases, lipases et amylases) sécrétées par les larves et la teneur des nutriments assimilés à travers les diètes alternatives consommées. Cette partie permet d'évaluer l'influence du prétraitement sur l'efficacité de l'activité enzymatique des larves cultivées sur les diètes à base de rejets hydrolysés. Cette partie permet d'établir une relation entre le taux d'enzymes et le type d'enzymes sécrétées par les larves (stade 5) et le bilan de masse des nutriments digérés et assimilés par ces larves (1 manuscrit soumis).

4.1 Conception de la diète alternative

4.1.1 Sélection et caractérisation des eaux usées agroindustrielles et des boues d'épuration

La caractérisation des rejets agro-industriels et municipaux montre une composition riche en nutriments (C_t , N_{org} , protéines, glucides, lipides et micronutriments). Les rejets agroindustriels sont cependant plus intéressants pour l'élevage du carpocapse de pomme (CP) à cause de leur potentiel nutritif plus élevé et surtout leur faible concentration en métaux qui ne présentent aucun risque pour l'environnement et pour le CP. La production des diètes à bases des rejets (boues et eaux usées) a été réalisée grâce aux travaux déjà effectués dans la littérature sur le potentiel nutritif et les propriétés physiques des rejets (Montgomery, 2004; Tyagi *et al.*, 2002; Barnabé *et al.*, 2009), sur la production des biopesticides *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Adjallé *et al.*, 2007; Vu *et al.*, 2009) et sur la productions des diètes servant à l'élevage du carpocapse de pomme (Brar *et al.*, 2008; Gnepe *et al.*, 2011). L'utilisation des rejets agroindustriels et des boues d'épuration comme agent nutritif de la diète peut fournir d'excellent élevage des larves de *Cydia pomonella* sur ces diètes. Durant cette étude, l'analyse des eaux usées de microbrasserie (EMB) a fourni les concentrations les plus élevées en protéines ($16,9 \pm 2$ g/L), en glucides ($25,5 \pm 5,5$ g/L), en lipides ($6 \pm 1,6$ g/L); en solides totaux ($66,5 \pm 6$ g/L) et en matières en suspension ($26,5 \pm 4$ g/L). Ces rejets d'EMB sont constitués en majorité de matières végétales (malt, maïs, houblon et fruits) et de levure dont la contribution dans la diète est très significative. Les boues issues d'industries de jus de pomme (POM) produites à partir des pommes broyées et filtrées sont riches en sucre avec un parfum et une structure qui sont naturellement appréciés par les larves. Les eaux usées d'industrie d'amidon (EUA) ont fourni les teneurs nutritives ($3,13 \pm 1,5$ g/L de protéine; $7,5 \pm 2,5$ g/L glucide et $3 \pm 0,5$ g/L lipides) les plus faibles. Ces rejets agroindustriels peuvent valablement remplacer certains ingrédients (Farine de soja, germe de blé et extrait de levure) communément utilisés comme source de glucide dans la production de la diète. À la suite des analyses physico-chimiques, les EMB et les POM ayant fournies les concentrations en nutriments et en rhéologies les plus intéressants sont utilisés pour la production des diètes. Les résultats de la caractérisation et du choix des rejets sont plus expliqués dans la partie I du chapitre 2 portant sur l'élevage du CP effectué sur les diètes produites à partir des rejets.

4.1.2 Influence des diètes alternatives sur la croissance de *Cydia pomonella*

Les résultats d'élevage observés montre que la diète à base de rejet microbrasserie et de la farine de soja (EMB+FS) a fourni les meilleures paramètres d'élevage (79% d'éclosions; 76 % du taux de survie des larves et 32% du taux de survie des adultes). Cela est dû au fait que la farine de soja (FS) est un ingrédient très riche en protéine (34%), en glucide (35%), en lipides (21%) et en minéraux et autres éléments (15%). Cet ingrédient présent en quantité plus importante (3,89 g farines de soja) que les autres ingrédients standards (2,4 g germes de blé et 1,4 d'extrait de levure) dans la diète, rend la masse de la diète plus dense et compacte en absorbant l'eau. De plus le rejet d'EMB, composé de végétaux de nature, a une concentration plus élevée en ST (65g/L), en carbone total (22,28 g/L), en protéine (19,52 g/L), en glucides (9,2 g/L) et en lipide (0,017 g/L) que le rejet de POM (45g/L ST, 14,04 g/L Ct, 16,03 g/L protéine, 8,15 g/L glucides et 0,015 g/L lipide). Ce rejet de composition hétérogène se mélange facilement dans l'eau avec les autres composants en offrant à la diète une densité de masse intéressante pour la croissance des larves. Cette composition fait que la diète EMB+FS a la perte d'humidité la plus faible et un pH 5 favorable à l'éclosion et la croissance des larves. Car, le pH des diètes alternatives (pH 4,2-5,4 pour les diètes à base de POM et pH 5-5,5 pour les diètes à base de rejets d'EMB) est proche de celui de la diète standards (pH 6) a favorisé l'éclosion des œufs et la croissance des larves.

Le temps influence très peu la croissance du CP si les conditions d'élevage sont respectées, même s'il est plus réduit (4-6 jours pour l'éclosion des œufs, 22-28 jours pour la croissance des larves, 10-15 jours pour la métamorphose dans les chrysalides et 7-10 pour le développement des papillons) lors de l'élevage effectués au laboratoire sur les diètes alternatives. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie 1 du chapitre 2 portant sur l'élevage du CP effectué sur les diètes à base des rejets de POM et d'EMB.

4.1.3 Bilan de masse des nutriments assimilés par les larves durant leur élevage

Le bilan de masse des nutriments assimilés par les larves cultivées sur les diètes alternatives à fourni d'excellent résultats ayant permis d'évaluer le potentiel nutritif apporté par les rejets. Ceci a permis aux larves d'atteindre l'étape de chrysalide.

La diète EMB+FS à fournir les meilleurs résultats d'assimilation de nutriments (1,2 g G_a , 1,1 g P_a , 0,3 g L_a) par rapport aux autres diètes et à la diète contrôle (1,2 g G_a , 1,2 g P_a , 0,6 g L_a). A cet effet, les nutriments assimilés sont notés P_a pour les protéines, G_a pour les glucides et L_a pour les lipides.

Le potentiel nutritif assimilé par les larves cultivées sur la diète EMB+FS est très élevés par rapport aux élevages effectués sur les autres diètes alternatives. Le bilan justifie la réussite de l'élevage effectuée sur les diètes testées. Pour plus d'explications se referez à la partie 1 du chapitre 2 portant sur le bilan de masse.

4.1.4 Étude des propriétés physiques des diètes sur la croissance du CP

L'étude de la rhéologie des diètes montre que les valeurs les plus élevées sont fournies par les diètes EMB+EL (934,6 mPa.s), POM+EL (786,4 mPa.s), EMB (950,7 mPa.s) et POM (793,7 mPa.s) par rapport aux autres diètes et à la diète standard de BioTepp (13,2 mPa.s). L'augmentation de la viscosité des diètes se justifie par la quantité des rejets apportés pour remplacer les ingrédients dont les masses sont différents (3,89 g de FS, 2,4 GB et 1,7 EL). La quantité d'ingrédients à remplacer est d'autant plus riche en nutriments que la quantité de rejet à ajouter alternativement dans la diète est élevée. En solution, le rejet EMB se comporte comme une argile et devient visqueux très rapidement en absorbant facilement l'eau. La viscosité des diètes produite avec POM est élevée lorsque ce rejet est en quantité importante dans la diète. Ce rejet est un composant qui décante très rapidement en solution, puisqu'il se solubilise difficilement.

Les résultats de l'analyse granulométrique montrent que contrairement aux résultats précédents, les valeurs obtenues ne dépendent pas de la concentration en rejet des échantillons. Les valeurs obtenues ont permis d'apprécier globalement la taille des particules de chaque ingrédient.

Ainsi, Les diètes produites avec la farine de soja (FS) ont fourni les tailles de particules les plus élevées (variant entre 224 et 570 μm) alors que les valeurs les plus faibles sont fournies par les diètes produites avec l'extrait de levure (variant entre 21,4 et 209 μm) par rapport à la diète standard (154 μm). Cela s'explique par le fait que la FS, étant un absorbant d'eau, s'adsorbe facilement avec les autres composants dans la diète en présence d'eau. Cependant l'extrait de levure (EL) apporté en faible quantité, se dissout facilement par rapport au germe de blé (GB) et la FS. Les diètes produites avec les rejets EMB sont composées de particules de tailles

beaucoup plus petites (environ 21.9 à 29.0 μm) que celles composées des rejets de POM (224 à 517 μm). Ces rejets d'EMB possèdent une bonne solubilisation, à l'instar des rejets de POM. Ce qui justifie la taille des particules de la diète EMB+FS ($33 \pm 8 \mu\text{m}$) qui est plus faible que celle de la diète standard ($110.9 \pm 34 \mu\text{m}$). Cela est dû au fait que la diète contrôle utilisée présente une composition en ingrédients de granulométrie différente. Les explications portant sur la viscosité et la taille des particules des diètes montrent pourquoi la diète EMB+FS a fourni les meilleurs résultats de cultures du CP durant cette étude. Ces résultats sont expliqués plus en détail dans la partie 2 du chapitre 2 portant sur les propriétés physiques (la viscosité et la taille des particules).

4.1.5 Optimisation de la diète produite avec les rejets de POM et d'EMB afin de rentabiliser la culture de *C. pomonella*

L'optimisation des diètes produites avec les rejets agroindustriels (POM et EMB) permet de déterminer le meilleur rejet et le meilleur ingrédient standard. Cela a permis d'obtenir la meilleure diète en termes de rhéologie et du potentiel nutritif indispensable pour un excellent élevage du lépidoptère *C. pomonella*. Pour atteindre ces objectifs, la méthodologie de la réponse en surface (MRS) a été utilisée à travers le plan expérimental du plan composite centré (PCC) de 2^5 avec 5 variables indépendantes (concentration de POM, EMB, FS, GB et EL) et 3 variables dépendantes (éclosions d'œufs, taux de survie des larves et le taux de survie des adultes) représentant les réponses. Ce plan nous a permis de tester 42 combinaisons et 6 réplicats de diètes en ce qui concerne les diètes produites avec les rejets EMB et POM. L'observation des résultats obtenue montre que la diète EMB+FS a fourni les meilleurs résultats de culture d'œufs (85%), de larves (76 %) et d'adultes (40 %) par rapport à la diète contrôle (90% œufs, 80% larves et 32% d'adultes). Ces résultats montrent que le rejet EMB et l'Ingrédient FS sont les meilleurs composants qui ont permis de produire la meilleure diète (EMB+FS) qui a fourni les meilleurs tests d'élevage d'œufs, de larves et d'adultes à cause des raisons déjà précitées.

La signification statistique du modèle polynômiale du second ordre a été vérifiée par ANOVA. Le facteur transcrit du modèle polynômiale du second ordre comprend un coefficient de détermination $R^2 = 0.80$ qui assure un ajustement du modèle quadratique des données expérimentales. Ainsi, en accord avec les données observées et en tenant compte des interactions existant entre EMB et POM, farine de soya (FS) et POM, EMB et FS, EMB et

germe de blé (GB), le modèle polynomiale de second ordre est présenté par l'équation suivante :

$$Y = 0 + (4.04 \times \text{POM} + 6.67 \times \text{BWW} + 4.55 \times \text{SF}) + 0 + (-0.41 \times \text{BWW} \times \text{POM} - 0.17 \times \text{POM} \times \text{SF} - 0.25 \times \text{BWW} \times \text{SF} - 0.63 \times \text{BWW} \times \text{WG}) \quad (24)$$

$$\beta_0 = 0 \quad \text{et} \quad \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 = 0 \quad \text{dans l'équation (24)}$$

Dans cette équation la variable indépendante correspond au pourcentage de survie des larves.

Les résultats obtenus et portant sur l'optimisation de la production de la diète sont expliqués dans la partie 3 du chapitre 2.

4.2 Prétraitement des rejets sélectionnés pour la production de la diète

4.2.1 Caractérisation du potentiel nutritif et des propriétés physiques des rejets hydrolysés

Les résultats observés dans cette thèse montrent un abattement élevé de la matière organique des EMB et POM. Cette réduction est plus importante (plus de 50%) après 45 minutes pour un traitement thermo-alkalin. La réduction de la matière organique (ST et MES) est plus élevée pour le rejet de POM qui est homogène (composition phénolique) et pâteux. Car, il se dégrade très rapidement par rapport au rejet de boues de micro brasserie qui est plus hétérogène en composants (malt, houblon, riz, maïs et fruits). De plus, l'hydrolyse améliore la biodégradabilité des rejets lorsque le temps de traitement est plus long et surtout quand la température est élevée. Car sous l'effet du temps et de la chaleur, la pression accélère la lyse des cellules bactériennes et des flocs en d'autres composés. De plus, le traitement alcalin (NaOH) accélère la réduction de la matière organique en matière minérale soluble et en composé volatil.

Durant le processus d'hydrolyse (100 °C, à pH 10 et après 30 minutes), le rejet d'EMB a fourni le potentiel nutritif (Ct, Nt, protéines, glucides et lipides) le plus élevé par rapport aux boues de POM: plus de 100% de protéines, plus de 150% de glucides et 50 % des lipides par rapport aux rejets non traités, dû à l'éclatement des cellules bactériennes.

À température acceptable (100 °C), la quantité des nutriments a augmenté de plus de 100 % pour les protéines, plus de 50% pour les lipides et 60% pour les glucides après le phénomène d'hydrolyse. Par contre, effectuée à des températures plus élevées (121°C), l'hydrolyse réduit légèrement le potentiel nutritif (C_t, N_t, N_{org}, protéines et lipides) des rejets après 45 minutes. Néanmoins, cela n'affecte pas la quantité en glucide du milieu qui résiste bien à la chaleur. Seulement les éléments inorganiques ou minéraux (métaux et N-NH₄⁺) et les glucides qui sont solubles continuent d'augmenter en solution après un traitement thermo-alkalin.

L'hydrolyse a contribué à diminuer la viscosité des rejets de POM (plus de 200 %) comparativement aux valeurs de viscosité enregistrées dans les rejets de EMB (+ de 100%). Cette réduction de la viscosité dans POM est due à la faible concentration en ST, de sa composition homogène et surtout de la biodégradabilité des boues en éléments minéraux. Cette hydrolyse réduit aussi considérablement la taille des particules de plus de 100%. L'utilisation de la Soude (NaOH 4 M) avant le traitement thermo-alkalin réduit la viscosité des rejets de 300 %

pour les POM et de 200% pour les EMB. La soude a pratiquement liquéfié toutes les particules des rejets sous formes solubles. Ainsi, l'hydrolyse thermo-alkaline permet d'obtenir une faible viscosité des rejets de POM et EMB traités. Cette viscosité est plus faible (54 mPa.s) pour la POM compte tenue de sa composition homogène, sa faible concentration en ST et MES. Aussi, pour améliorer le potentiel nutritif et les propriétés physiques des diètes à base des rejets utilisés pour la culture des larves de *C. pomonella*, le meilleur traitement a été l'hydrolyse effectuée à 100 °C, durant 30 minutes. L'effet de l'hydrolyse sur le potentiel nutritif et les propriétés physiques des rejets hydrolysés est expliqué dans la partie 1 du chapitre 3.

4.2.2 Effet du prétraitement sur les diètes et la croissance des larves du CP

L'observation de ces résultats montre que les diètes à base de rejets d'EMB hydrolysés (à 100 °C et durant 30 minutes) ont fourni des résultats intéressants (93% d'éclosions; 85 % du taux de survie des larves et 70% du taux de survie des adultes) par rapport à la diète à base d'EMB non hydrolysé et à la diète contrôle (90% d'éclosions; 80 % du taux de survie des larves et 62% du taux de survie des adultes). Cela s'explique par le fait que la réduction de la viscosité et de la taille des particules des rejets EMB après 30 min d'hydrolyse a amélioré la texture et le potentiel nutritif des diètes produites avec ce rejet. Ces nouvelles diètes ont favorisé l'élevage des insectes par rapport à l'élevage effectué sur les diètes à base des rejets traités à pH-7 et à pH-10 à cause de l'alcalinité qui affecte et réduit l'éclosion des œufs et la croissance des larves.

Les diètes produites avec les rejets hydrolysés ont fourni des résultats des tailles des particules plus faibles (plus de 100 fois) que celles des diètes produites avec les rejets non hydrolysés. Cela est dû à l'hydrolyse qui a contribué à réduire les tailles des particules de ces rejets. La viscosité des diètes produites avec les rejets non hydrolysés (varie de 303 à 987 mPa.s) a été réduite de plus de 20% pour les diètes produites avec les rejets hydrolysés (260 à 641 mPa.s). La viscosité de la diète standard de Biotepp (142 mPa.s) est la plus faible compte tenu de ces ingrédients qui sont bien broyés en industrie.

Les diètes produites avec les ingrédients de farine de soya (FS) et germes de blé ont fourni des viscosités très faibles du fait de la faible quantité de rejets apportés pour remplacer ces ingrédients. Par contre, les diètes EMBH+FS (525 mPa.s) ou POMH+FS (392 mPa.s) produites avec uniquement avec les rejets hydrolysés et la FS ont fourni d'excellentes viscosités qui a permis un bon élevage des larves. Cela est dû aux propriétés physiques de la farine de soja qui est un absorbant d'eau dans la diète. Cette propriété lui confère une viscosité plus intéressante

pour l'élevage des larves en lui apportant une densité de masse importante. L'effet de l'hydrolyse sur le potentiel nutritif et les propriétés physiques des diètes alternatives et la croissance des larves est détaillé dans la partie 1 du chapitre 3 portant sur le prétraitement d'hydrolyse.

4.3 Influence de l'activité enzymatique sur la digestion des aliments par les larves de *C. pomonella*

L'évolution des équipements de la digestion des enzymes digestifs des larves matures (après 24-28 jours) a été étudiée. Cette analyse a été menée à travers l'observation de la croissance progressive de l'activité des protéases, des amylases et des lipases. L'analyse des extraits intestinaux des larves indiquent que les diètes ingérées ont un rôle qualitatif que quantitatif dans la sécrétion des enzymes digestifs par les larves.

La mesure de l'activité enzymatique des larves s'est effectuée sur un échantillonnage représentatif (10-15 larves) pour toutes les diètes. Les résultats enzymatiques observés sont élevés pour les larves dont la taille est plus importante (2-3 mm) sur les diètes qui ont fourni un taux de survie de croissance des larves plus élevée (70-90 %) par rapport à la diète contrôle (80 %). Ces résultats montrent que les larves sécrètent une quantité plus élevée d'amylases (2,9 mg/L) que de protéases (59,66 UI/mL) et de lipases (1,93 U / mg d'enzymes) durant leur digestion. Le bilan de masse des nutriments étudié justifie que la concentration élevée du nutritif présent dans la diète entraîne chez les larves, une sécrétion élevée des enzymes spécifique à ce nutriment pour le digérer. Ainsi, la concentration en glucides étant la plus élevée contrairement à la concentration en lipides qui est la plus faible dans la diète s'explique par le fait que la quantité des amylases sécrétée est plus élevée que la quantité de lipases sécrétée par les larves pour digérer ces nutriments dans les diètes. Cette activité enzymatique est plus importante (20 % amylases, 10 % protéase et 5 % lipase) pour les larves élevées sur les diètes à base de rejet de POM ou EMB mélangé avec la farine de sojas (FS) par rapport aux autres diètes. Ce résultat est plus élevé (30 % amylases, 20 % protéase et 3 % lipase) pour les diètes à base de rejets hydrolysés, et plus élevée encore (45 % amylases, 35 % protéase et 3 % lipase) pour les diètes à base de rejet EMB hydrolysé par rapport à la diète contrôle (40 % amylases, 27 % protéase et 10 % lipase). Ces résultats montrent que l'hydrolyse diminue la concentration en lipides des rejets et par conséquent la concentration des lipides dans les diètes. La quantité de lipases nécessaire pour digérer ces lipides est aussi réduite. L'influence de l'activité enzymatique sur la croissance des larves est indiquée dans la partie 1 du chapitre 4 portant sur l'activité enzymatique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR & Surampalli RY (2007) Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochem.* 42 (9): 1302-1311.
- Ahn J-H, Shin S G & Hwang S (2009). Effect of microwave irradiation on the disintegration and acidogenesis of municipal secondary sludge. *Chemical Engineering Journal* 153: 145-150.
- Alston DG, Murray M, Reding ME (2010) Codling Moth *Cydia pomonella*. Published by Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory ENT-13-06. <http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/ENT-13-06.pdf>
- APHA, AWWA & WEF (2005) Standard methods for the examination of water and Wastewater, 21st Edition.
- Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, Satoh H & Matsuo T (2001) Sludge hydrolysate as a carbons source for denitrification. *Water Sci. Technol.* 43 (1): 191-199.
- Arijs Y, De-Clercq P (2004) Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *BioControl* 49: 505-516.
- Arthurs S P & Lacey LA (2004) Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards. *Biological Control* 31: 3, 388-397. 32 ref.
- Ballard J, Ellis DJ & Payne CC (2000) The role of formulation additives in increasing the potency of *Cydia pomonella* granulovirus for codling moth larvae, in laboratory and field experiments. *Biocontrôle Science and Technologie* 10: 627-640.
- Barnes MM (1991) Codling Moth Occurrence, Host Race Formation, and Damage. In World Crop Pests: "Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control". *Elsevier* 5: 313-327.
- Barnabé S (2004) *Hydrolysis and partial oxydation of wastewater sludge as raw material to produce Bacillus thuringiensis HD-1*. PhD Thesis, INRS-ETE, University of Québec, Canada, pp 63-70.
- Barnabé S, Brar SK, Tyagi RD, Beauchesne I & Surampalli RY (2009) Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products - Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment* 407: 1471-1488.
- Basil A (2003) Description scientifique des baculovirus génétiquement modifiés en vue d'applications en gestion des insectes forestiers. Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grands Lacs Sault Ste. Marie (Ontario).

- Beck SD, chippendale GM & Swinton DE (1968) Nutrition of the European corn borer, *Ostinia nubilalis*. VI. A larval rearing medium without crude plant fractions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61:459-462.
- Ben RF, Prévost D, Yezza A & Tyagi RD (2007) Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology* 98: 3535–3546.
- Benlismane A, François P & Bekkour K (2011) Comportement mécanique des boues biologiques en écoulement. *La houille blanche* 5 : 34-39.
- Bogdanow, EA (1908) Über das Ablängigkeit des Wachstums der Fliegenlarven von Bakterien und Fermenten und über Variabilität und Vererbung bei den Fleischfliegen. *Arch. Anat. Physiol. Abt. Suppl.* 173-200.
- Boivin T, Chabert HC, Bouvier JC, Beslay D & Sauphanor B (2001) Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 381-386.
- Bougrier C, Delgenès JP & Carrère H (2007) Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 34: 20-27.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD & Valero JR (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41, 323–342.
- Brar SK, Verma M, Valero JR, Tyagi RD & Surampalli RY (2008) Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2849–2857.
- Cao G & Prior RL (1999) Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* 299: 50-62.
- Caprile J & Vossen P (2005) Codling moth, *Cydia (Laspeyresia) pomonella*, is a serious insect pest of apples, pears, and English walnuts. University of California, division of Agriculture and Natural Resources. Publication 7412.
- Carroll M, Hanlon A, Hanlon T, Zangerl AR & Berenbaum MR (1997) Behavioral effects of carotenoid sequestration by the parship webworm, *Depressaria pastinacella*. *J. Chem. Ecol.* 23: 2707-2719.
- Carruthers WR, Cory JS & Entwistle PF (1988) Recovery of pine beauty moth *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus from pine foliage. *J. Invertebr. Pathol.* 52:27–32.
- Chapman RF (1998) The Insects: Structure and Function (4th ed) Cambridge University Press UK: 770pp.
- Charmillot PJ, Hofer D & Pasquier D (2000) Attract and kill: a new method for control of the codling moth *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Applicata* 94: 211-216.

- Chippendale GM (1978) the function of carbohydrates in insect life processes, in biochemistry of insects. Academic Press, New York: p 2-57.
- Chu CP, Lin WW, Lee DJ, Chang BV & Peng XF (2002) Thermal treatment of waste activated sludge using liquid boiling. *Journal of Environ Engineering*: 1100-1103.
- Climent M, Ferrer I, Baeza M del M, Artola A, Vázquez F & Font X (2007) Effects of thermal and mechanical pretreatments of secondary sludge on biogas production under thermophilic conditions. *Chemical Engineering Journal* 133: 335-342.
- Cohen AC (1998) Artificial media for rearing entomophages comprising cooked, whole egg. (12333 S. Shoshoni Dr., Phoenix, AZ, 85044). Application Number:08/669389.
- Cohen AC (2000) A review of feeding studies of *Lypgus* spp. with emphasis on artificial diets. *Southwest. Entomol. Suppl.* 23: 111-119.
- Cohen AC (2001) Formalizing insect rearing and artificial diet technology. *Am. Entomol.* 47: 198-206.
- Cohen A C (2004) Insect diet- Science and Technology. CRC Press, New York: 324 pp.
- Cory J.S., Myers J.H. (2003) The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34:239-72.
- Cossentine JE & Jensen LBM (2004) Persistence of a commercial codling moth granulovirus product on apple fruit and foliage. *J. Entomol. Soc. Brit. Columbia*, 101: 87-92.
- Cristián TP & Marcos GP (2000) Evaluation of five species of *Trichogramma* as biological control agents for *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera:Tortricidae). *Agricultura Técnica* 60: 282-288.
- Dadd RH (1985) Nutrition: organisms, in comprehensive insect physiology. Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press 4: 313-390.
- DeFillippis VR & Villarreal LP (2000) An introduction to the evolutionary ecology of viruses. See Hurst 2000 pp. 125-208.
- DeFoliart GR (1999) Insects as food, *Annu, Rev. Entomol.* 44: 21-50.
- Dhadialla TS, Carlson GR & Le DP (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Ann. Rev. Entomol.* 43, 545-569.
- Doğan I & Sanin FD (2009) Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. *Water Research* 43: 2139-2148.
- Drouin M, Lai CK, Tyagi RD & Surampali RY (2007) *Bacillus licheniformis* protease as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy*. New Brunswick, Canada.

- Dossier Biocontrôle au Rythme Cubain (2005) Bulletin Canadien de l'écogestion des insectes et des maladies des plantes.
- Dunley JE & Welter SC (2000) Correlated insecticide cross-resistance in azinphos-methyl resistant codling moth (*Lepidoptera: Tortricidae*). *J. Econ. Entomol.* 93: 955-962.
- Duval J (1994) le carpocapse de la pomme. Ecological Agricultural Projects. AGRO-BIO – 330 – 01.
- Erlandson M & Goettel M (2007) Agriculture et Agroalimentaire Canada. Web (<http://www.biocontrol.ca>). Web du Centre pour la lutte antiparasitaire en Agriculture et agroalimentaire au Canada (http://www.agr.gc.ca/env/pdf/cat_e.pdf).
- Eskilsson CS & Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography* 902 (1): 227-50.
- Eskicioglu C, Kennedy KJ & Droste RL (2006) Characterization of soluble organic matter of waste activated sludge before and after thermal pretreatment. *Water Research* 40: 3725-3736.
- Federici BA (1997) *Baculovirus* pathogenesis. In: Miller, L.K. (Ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York, pp. 33-59.
- Frolund B, Griebbe T & Nielsen PH (1995) Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology Biotechnology* 43: 755-761.
- Gao X, Bjork L, Trajkovski V & Uggla (2000) Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2021-2027.
- Genc H (2002) *Phaon crescent, Phyciodes phaon: Life cycle, nutritional ecology and reproduction*. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA.
- Genc H & Nation JI (2004) An artificial diet for the butterfly *Phyciodes phaon* (Lepidoptera: Nymphalidae) *Florida Entomol.* 87(2):194-198.
- Genc H (2006) General Principles of Insect Nutritional Ecology. *Trakya Univ J Sci*, 7(1): 53-57.
- Giroux S, Côté JC, Vincent C, Martel P & Coderre D (1994) Bacteriological insecticide M-One effects on the mortality and the predation efficiency of adult spotted lady beetle *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Econ. Entomol.* 87:39-43.
- Gnepe JR, Brar SK, Tyagi RD & Valéro JR (2011) Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides. *Journal of Environmental Science and Health Part B* (2011) 46, 1–12.
- González RH (2005) Alternative proposals of chemical and hormonal control of the codling moth. Institution Facultad de Ciencias Agronomicas, Universidad de Chile, Chile. *Revista Fruticola. Copefrut S.A., Curico, Chile*: 2005. 26: 3, 89-102. 9 ref.
- Gordh G & Headrick D (2001). *A Dictionary of Entomology*. CABI Publishing, New York.

- Gordon Ht (1959) Minimal nutritional requirements of the German roach, *Blatella germanica* L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77:290-315.
- Guillon M & Biache G (1995) IPM strategies for control of codling moth (*Cydia pomonella* L.) interest of CmGV for long term biological control of pest complex in orchards. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 60: 695-705.
- Hall-Beyer, Bart & Richard J (1989) Ecological fruit production in the north. C.P.721, Trois-Rivières, p.162.
- Hansen JD & Anderson PA (2006) Mass rearing codling moths: improvements and modifications. *Journal of Entomology Society of British Columbia* 103 (9): 33-36.
- Hardie J, Peace L, Pickett JA, Smiley DWM, Storer JR & Wadhams LJ (1997) Sex pheromone stereochemistry and purity affected field catches of male aphids. *J. Chem. Ecol.* 2
- Harrison EZ, Oakes SR, Hysell M & Hay A (2006) Organic chemicals in sewage sludges. *Science of the Total Environment* 367: 481-497.
- Haydak M H (1953) Influence of the protein level of the diet on the longevity of cockroaches. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 46:547-560.
- Helsen H, Blommers L & Vaal F (1992) Efficacy and implementation of granulosis virus against codling moth in orchard IPM. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, 57: 569-573. 3:2547-2554.
- House HL (1974) Nutrition. Ed. Academic Press, New York, in *The physiology of insect* vol.5: 51-62.
- Hughes PR & Wood HA (1998) Production of pharmaceutical and other recombinant proteins in insect larvae. *SIM News* 48: 105.
- Hull LA, Pfeiffer DG & Biddinger DJ (1995) Apple-direct pests. In *Mid-Atlantic Orchard Monitoring Guide*. Natural Resources, Agricultural and Engineering Service, Ithaca, New York: pp 5-17.
- Ioriatti C & Bouvier JC (2000) La resistenza agli insetticidi; il caso della carpocapsa (*Cydia pomonella* L.), *Inf. Fitopatol.* 9: pp. 5-10.
- Jin Y, Li H, Mahar RB, Wang Z & Nie Y (2009) Combined alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before aerobic digestion. *Journal of Environmental Sciences* 21: 279-284.
- Johnson KS & Felton GW (2001) Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *J. Chem.Ecol.* 27: 2579-2597.
- Judd GJR, Gardiner MGT & Thomson DR (1997) Control of codling moth in organically-managed apple orchards by combining pheromone-mediated mating disruption, post harvest removal and tree banding. *Entomol. Exp. Appl.* 83 :137-146
- Katsiris N & Kouzeli-Katsiri A (1987) Bound water content of biological sludges in relation to filtration and dewatering *Water Res.* 2, 1 (II): 1319-1327.

- Kienzle J, Schulz C, Zebitz CPW & Huber J (2002) Persistence of the biological effect of codling moth granulovirus in the orchard-preliminary field trials. Institute for Phytomedicine, University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany. ref. Editor Fordergemeinschaft Okologischer Obstbau e. V:187-191.
- Kim JH & Mullin, CA (1998) Structure-phagostimulatory relationships for amoniacids in adult western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *J. Chem. Ecol.* 24:1499-1511.
- Kim J, Park C, Kim T-H, Lee M, Kim S, Kim S-W & Lee J (2003). Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 (3): 271-275.
- Knipling EF (1979) The basic principales of insect population suppression and management. *USDA Agric. Handb.* 512.
- Knox RB, Ladiges PY & Evans BK (1994) Biology. McGraw Hill, Sydney.
- Kuhr U, Samietz J & Dorn S (2006) Effect of plant architecture and hail nets on temperature of codling moth habitats in apple orchards. *Entomologia Experimentalis and Applicata* UK. 118: 3, 245-259.
- Lacey LA & Siegel JP (2000) Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers: pp. 253-273.
- Lacey L.A., Shapiro-Ilan D.I. (2003) The potential role for microbial control of orchard insect pests in sustainable agriculture. *J. Food Agric. Environ.*, 1: 326-331
- Lacey LA, Arthurs SP, Knight A, Becker K & Headrick H (2004) Efficacy of codling moth granulovirus: effect of adjuvants on persistence of activity and comparison with other larvicides in a Pacific Northwest apple orchard. *J. Entomol. Sci.*, 39: 500-513.
- Lacey LA & Arthurs SP (2005) New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 85-90.
- Lacey LA, Arthurs SP & Headrick H (2005a) Comparative activity of the codling moth granulovirus against *Grapholita molesta* and *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 102: 79-80.
- Lacey LA, Neven LG, Headrick HL & Fritts RJ (2005b) Factors affecting entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) for control of overwintering codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in fruit bins. *J. Econ. Entomol.*, 98: 1863-1869.
- Lacey LA, Arthurs SP, Unruh TR, Headrick H & Fritts RJ (2006) Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment, and post-application irrigation. *Biological Control, Elsevier* 37: 214-223. .

- Lacey LA & Unruh TR (2007) *Biological control of codling moth (Cydia pomonella; lepidoptera: tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. Vedalia* 12: 33-60.
- 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, Canada, 79 pages+annexes.
- Li YY & Noike T (1992) Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pre-treatment. *Water Sci. Technol.* 26: 857-866.
- Liao PH, Wong WT & Lo KV (2005) Release of phosphorus from sewage sludge using microwave technology. *J. Environ. Eng. Sci.* 4: 77-81.
- Li H, Jin Y, Mahar RB, Wang Z & Nie Y (2008) Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment. *Bioresource Technology* 99: 5140-5144.
- Lin J-G, Ma Y-S, Chao AC & Huang C-L (1999) BMP test on chemically pretreated sludge. *Bioresource Technology* 68: 187-192.
- Mattedi L, Forno F & Varner M (2006) Attention to surprises of the apple worm. Source Informatore Agrario. Edizioni *l'Informatore Agrario Srl, Verona, Italy*: 62: 31, 69-72.
- McBride M-B (1998) Soluble trace metals in alkaline stabilized sludge products- *J. Env. Qual-water*, 27:578-584.
- Miron Y, Zêeman G, Van Lier JB & Lettinga G (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.
- Montgomery R (2004) Development of biobased products. *Biores Technol*, Vol. 91, pp.1-29.
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107, 254-255.
- Mottet A, Steyer JP, Déléris S, Vedrenne F, Chauzy J & Carrère H (2009). Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 46: 169-175.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcón FJ & Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Kugler Publications, Amsterdam/New York, *Fish Physiology and Biochemistry* vol. 15 no. 2 pp 121-130.
- Nation JL (2001) *Insect Physiology and Biochemistry*. Boca Raton, Fla., CRC Press: 485 pp.
- Neyens E & Baeyens J (2003) A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials B98*, 33-50.

- Neyens E, Baeyens J, Dewil R & De heyder B (2004) Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *Journal of Hazardous Materials* 106B, 83–92.
- Normes OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la protection des plantes) (2001) Directives sur la bonne Pratique Phytosanitaire- Arbres Fruitiers à Pépins- *Cydia Pomonella* (Carpocapse) : pp 2-18(1).
- Odegaard H, Paulsrud B & Karlsson I (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):295-403.
- Ohgushi T (1992) Resource limitation on insect herbivore populations. In: *Effects of source distribution on animal-plant interactions*. Academic Press, San Diego: pp. 199-241.
- Osborn TB & Mendel LB (1932) A modification of the Osborne-Mendel salt mixture containing only inorganic constituents. *Science*, 75:339-340.
- Panneton B, Vincent C & Fleurat-Lessard F (2000) Place de la lutte physique en phytoprotection, pp. 1-24 in C. *INRA Editions*, Paris, 347 p.
- Park C, Lee C, Kim S, Chen Y & Chase HA (2005). Upgrading of Anaerobic Digestion by Incorporating Two Different Hydrolysis Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2): 164-167.
- Penaud V, Delgènes JP & Moletta R (1999) Thermo-chemical preheatment of a microbial biomass: influence of 56dirrm hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enz. Microbial Technol.*, 25: 258-263.
- Pham TTH, Brar SK, Tyagi RD & Surampalli RY (2009) Ultrasonification of wastewater sludge - Consequences on biodegradability and flowability. *Journal of Hazardous Materials* 163, 891-898.
- Pham TTH, Brar SK, Tyagi RD & Surampalli RY (2010) Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrasonics Sonochemistry* 17, 38-45.
- Rafoss T & Saethre MG (2003) Spatial and temporal distribution of bioclimatic potential for the codling moth and the Colorado potato beetle in Norway: model predictions versus climate and field data from the 1990s. *Agricultural and Forest Entomol.* 5 (1): 75-85.
- Rajan RV, Lin JG & Ray BT (1989) Low-level chemical pretreatment or enhanced sludge solubilization, *Res J. WPCF*, 61 (11-12): 1678-1683.
- Raunkjaer K, Hvitved-Jacobsen T & Nielsen PH (1994) Measurements of pools protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Res* 28: 251-262.
- Reardon J & Berkett LP (2003) Key Arthropods and Diseases Affecting Apples: A *Synopsis*. Photo credits: L.P. Berkett; Instructional Media Center, Mich. State University, East Lansing, MI. The University of Vermont.

- Recchia C (2010). «Hydratation (<http://www.rmc.fr/blogs/jardin.Php.archive/2010/07/02>)» sur RMC.
- Reuveny H & Cohen E (2007) Toxicity of azinphos-methyl to various development stages of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science* 63: 129–133.
- R.J.A.E.-(Regroupement pour le jardinage amateur et écologique) (1991) Guide de protection et d'entretien écologique des pommiers et autres arbres fruitiers. p.37.
- Roberts WP & Hagley EAC (1986) Pest Management Program for Apple Series: Codling Moth. Ontario Ministry of Agriculture and Food, Toronto. 2 pp.
- Roger C, Vincent C & Coderre D (1995) Mortality and predation efficiency of *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coccinellidae) following application of Neem extracts (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). *J. Appl. Entomol.* 119: 439-443.
- Roux J-L (1994) Conserver les aliments, Comparaison des méthodes et des technologies des aliments. *Technique et Documentation – Lavoisier* : p 436-456.
- Rojas LI, Cruz-Camarillo R, Guerrero MI, Rodriguez-Vasquez R & Ibarra JE (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.
- Sachveda V, Tyagi RD & Valéro JR (1999) Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Res. Devel. Microbial.*, 3; 363-375.
- Saethre MG & Hofsvang T (2002) Effect of temperature on oviposition behavior, fecundity, and fertility in two northern European population of the codling moth (Lepidoptera: tortricidae). *Environn. Entomol.* 31 (5): 804-815.
- Saksinchai S, Supphantharika M & Verduyn C (2001) Application of 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.
- Salsabil MR, Laurent J, Casellas M & Dagot C (2010) Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the reduction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials* 174 (1-3): 323-333.
- Sauphanor B, Berling M, Toubon JF, Reyes M & Delnatte J (2006) Carpocapse des pommes: cas de résistance aux virus de la granulose dans le Sud-Est. *Phytoma* 590, 24-27
- Schieder D, Schneider R & F-Bischof (2000). Thermal hydrolysis (TDH) as a pretreatment method for the digestion of organic waste. *Water Sci. Technol.* 41 (3): 181-187.
- Setyobudi L (1990) Seasonality of codling moth, *Cydia pomonella* L., (Lepidoptera: Olethreutidae) in the Willamette valley of Oregon: Role of photoperiod and temperature, Thesis, Oregon State University, 129 pp.
- Shanableh A & Jomaa S (2001). Production and transformation of volatile fatty acids from sludge subjected to hydrothermal treatment. *Water Sci. Technol.*, 44 (10): 129-135.

- Singh P (1977) Artificial diet for insects, Mites, and spiders. Plenum Press, New York: 594 pp.
- Stamopoulos DC, Diamantidis G & Chloridis (1993) Activités enzymatiques du tubes digestif du prédateur *Podisus maculiventris* (Hem.:Pentatomidae). *Entomophaga* 38 (4): 493-499.
- Slansky JF & Rodríguez JG (1987) Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates. Wiley, New York, An overview: pp 1-69.
- Stauffer C (1989) Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York.
- Steineke SB & Jehle JA (2004), 'Investigating the Horizontal Transmission of the *Cydia pomonella* Granulovirus (CpGV) in a Model System', *Biological Control*, 30, 538_545.
- Stelljes KB (2001) Fruit perfume lures female codling moths. *Ag. Res.* 49: 10-12.
- Tanada Y (1964) A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapse pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. Insect Pathol.*, 6: 378-380.
- Tanaka S, Kobayashi T, Kamiyama K & Bildan MLNS (1997). Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 35 (8): 209-215.
- Terra WR & Ferreira C (1994) *Comp. Biochem. Physiol.* 109B (1), 1-62.
- Tirado-Montriel MTL, Tyagi RD & Valéro JR (1998) Production of *Bacillus thuringiensis* using waste materials. In: Martin, A. M. (éd.), *Bioconversion of waste materials to industrial products*, Blackie Academic Press & Professionnal, UK: p.480-516.
- Toba HH & Howell JF (1991) An improved system for mass-rearing codling moths. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 88: 22-27.
- Toreci I, Kennedy KJ & Droste RL (2009) Evaluation of continuous mesophilic anaerobic sludge digestion after high temperature microwave pretreatment. *Water Research* 43:1273-1284.
- Torres M & Lioréns Ma del CE (2008). Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Management* 28: 2229-2234.
- Tu z & Hagedorn HH (1992) Purification and characterization of pyruvate carboxylase from the honey bee and some properties of related biotin-containing proteins in other insects. *Arch. Insect Bioch. Phys.* 19:53-66.
- Turunen S (1979) Digestion and absorption of lipids in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A: 455-460.
- Tyagi RD, Sikati FV, Barnabé S, Vidyarthi AS & Valéro JR (2002) Simultaneous production of biopesticide and alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material. *Water Science Technology* 46: 247-254.
- Vanderzant ES (1974) Development, significance, and application of artificial diets for insects. *Annu. Rev. Entomol.* 19: 139-160.

- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Valéro JR & Surampalli RY (2005) Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma* sp.): Role of pre-treatment and solids concentrations. *Water Research* 39: 3587-3596.
- Verma M, Satinder KB, Riopel AR, Tyagi RD & Surampalli RY (2007) Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study. *Environmental Technology* 28: 273-284.
- Versoi PL & French LK (1992) The establishment of commercial insectaries, in advances in insect Rearing for research and Pest Management. Anderson T.E. and N.C. Leppla, Eds. Westview Press, new Dheli, 457- 463.
- Vidarthi AS, Tyagi RD, Valéro JR & Surampalli RY (2002) Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* using wastewater sludge as a material. *Water res.*, 36: 4850-4860.
- Vincent C (1998) Les biopesticides. *Antennae* (Eds.) 5 (1): 7-29.
- Vincent C & Coderre D (1992) La lutte biologique. Gaëtan Morin Editeur (Montréal) et Lavoisier Tech Doc (Paris), (Eds.) 671 p.
- Vincent C & Panneton B (2001) Les Méthodes De Lutte Physique Comme Alternatives Aux Pesticides. *VertigO - La revue en sciences de l'environnement sur le WEB*, Vol 2 No 2.
- Vlyssides AG & Karlis PK (2004) Thermal-alkaline solubilisation of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 91: 201-206.
- Vu KD, Tyagi RD Valero JR & Surampalli RY (2009) "Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starh industry wastewater", *Bioprocess Biosyst Eng* vol. 32, pp. 511-519.
- Weeden CR, Shelton AM & Hoffman MP (2008) Commande biologique: Un guide des ennemis normaux en Amérique du Nord. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/>.
- Welter SC (2006) Codling Moth (*Cydia pomonella*) and Its Control. Extension Entomologist. Guide H-427,
- Welty C (1992) Codling Moth On Fruit Trees. Ohio State University Extension Fact Sheet, Entomology. HYG-2203-92.
- Wiggins JC (2004) Diet composition and method for rearing insects. N° PUB, US 2004/0228947 A1.
- Wilson CA & Novak JT (2009) Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water research* 43: 4489-4498.
- Wood HA & Granados RR (1991) Genetically engineered baculovirus as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 68-87.
- Yee JM & Yee S (1990) Bugwatch: a microcomputer-based monitoring program for pests of apples and peaches in Ontario. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 121: 123-126.

- Yezza A, Tyagi RD, Valéro JR & Surampalli RY (2004) Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor. *Bioresource Technology* 97, 1850-1857.
- Yezza A (2005) 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, INRS-ÉTÉ, Université du Québec, Canada.
- Zouari N & Jaoua S (1999) The effect of complex carbon and nitrogen, salt, tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:497-502.

CHAPITRE II:

**CONCEPTION D'UNE DIÈTE ÉCONOMIQUE À
PARTIR DES EAUX USÉES ET DES BOUES**

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article.

Gnepe, J. R.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D., and Valéro, J. R. (2011) Agro-industriel waste as ingredient replacement for colding moth diet. Rejets agroindustriels utilisés comme ingrédients alternatives pour la prouction de la diète du carpocapse de pomme. Nova Science Publishers (2011) chapitre 3854

CHAPITRE II - PARTIE 2

RHEOLOGICAL PROFILE OF DIETS PRODUCED USING AGRO-INDUSTRIAL WASTES FOR REARING CODLING MOTH LARVAE FOR BACULOVIRUS BIOPESTICIDES

*PROFIL RHÉOLOGIQUE DES DIÈTES PRODUITES À BASE DES
REJETS AGROINDUSTRIELS POUR L'ÉLEVAGE DES LARVES DU
CARPOCAPSE DE POMME UTILISÉES POUR LA PRODUCTION DU
BIOBESTICIDE BACULOVIRUS*

J. R. Gnepe¹, R.D.Tyagi^{1*}, S. K. Brar¹, J.R. Valero¹

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

RÉSUMÉ

L'étude de la rhéologie des diètes à base des rejets agroindustriels (eaux usées de micro-brasseries et boues d'industrie de jus pomme) a permis de produire des diètes plus adaptées à fournir des nutriments indispensables à la croissance du carpocapse de pomme (CP). La capacité nutritive (g/L), des eaux usées de micro-brasseries (EMB) ($25,5 \pm 3,5$ glucides; $16,9 \pm 2$ protéines; $6 \pm 0,6$ lipides) et des rejets de jus de pomme (POM) ($22,0 \pm 2,3$ glucides; $11,3 \pm 1,1$ protéines; $2 \pm 0,2$ lipides) est essentielle et importante pour remplacer les ingrédients (farine de soja-FS, germe de blé-GB, extrait de levure-EL) de la diète standard utilisée pour l'élevage des larves du CP. Les additifs ajoutés à ces diètes ont aussi contribué à la conservation de leur texture et leur teneur nutritive. Les œufs et les larves du CP sont élevés sur les diètes alternatives suivant les conditions industrielles ($16:8$ h de photopériode; 25 ± 1 °C et $50 \pm 0,5$ % of humidité). L'assimilation la plus élevée des nutriments a été observée pour les diètes à base d'EMB et la diète contrôle en calculant le ratio du taux d'éclosion des œufs (de 0,48 à 0,71); de croissance des larves (de 0,23 à 0,4) et de fécondité (de 1,33 à 3). Les excellents résultats de croissance des larves et de fécondité du CP sont attribués à la viscosité moyenne (variant de 50 à 266 mPa.s⁻¹), à la taille moyenne des particules (variant de 24,3 µm à 88,05 µm pour EMB, par rapport à 110 µm pour la diète contrôle) et les solides totaux (145,88 g/L POM+YE; 162,08 g/L BWW + YE; 162,2 g/L POM + WG; 173 g/L contrôle; 174,3 g/L BWW + WG) des diètes. La faible viscosité a favorisé l'amélioration des diètes tout en facilitant l'assimilation des nutriments par les larves. Ainsi, la rhéologie est un paramètre important durant la préparation des diètes et donc indispensable pour l'assimilation parfaite des nutriments qui est un élément déterminant pour une excellente croissance des larves du CP.

Mots clés: eaux usées agro-industrielles, diète, *Cydia pomonella*, larve, viscosité, rhéologie, tailles des particules.

ABSTRACT

The rheological study of the diets using the agro-industrial wastes (brewery wastewater and pomace waste) was carried out in order to obtain a diet most adapted to supply nutrients for growth of codling moth (CM) larvae. Nutritive capacity (g/L) of brewery wastewater (BWW) (25.5 ± 5.5 carbohydrates; 16.9 ± 2.1 proteins; 6 ± 1.6 lipids) and pomace waste (POM) (22.0 ± 0.03 carbohydrates; 11.3 ± 1.3 proteins; 2 ± 0.2 lipids) were essential and important as replacement or in association with other ingredients (soya flour-SF, wheat germ-WG, yeast extract-YE) of the standard diet for the breeding of codling moth larvae. These diet additives also contributed to the preservation of texture and nutritive content of larvae diet. The eggs and CM larvae were grown on alternate diets under industrial conditions (16:8 h photoperiod; 25 ± 1 °C and 50 ± 0.5 % of humidity). The higher assimilation of nutrients of the diets in BWW and control diet was observed by calculating the rate of hatching of eggs (0.48 to 0.71); larvae growth (0.23 to 0.4) and fertility (1.33 to 3). The excellent growth and fertility rates of codling moth larvae were attributed to variations in viscosity (varying from 50 to 266 mPa.s⁻¹), particle size (varying 24.3 µm in 88.05 µm with regard to 110 µm the control diet) and total solids (145.88 g/L POM+YE; 162.08 g/L BWW + YE; 162.2 g/L POM + WG; 173 g/L control; 174.3 g/L BWW + WG) diets. Lower viscosity favored improved diet due to ease of assimilation of nutrients. Thus, rheology is an important parameter during preparation of diets for growth of codling moth larvae as it will dictate the nutrient assimilation which is an important parameter of larvae growth.

Keywords: Agro-industrial wastewater, diet, *Cydia pomonella*, larvae, viscosity, rheology, particle size.

Introduction

Rheology is defined by the deformation of flow under the effect of mechanical stress. Rheology has been very widely used as a tool for stabilization of wastewater sludge, dewatering, value-added products as well as transportation, storage, operation of bioreactors and pumping of sludge (Abu-Orf & Örmeci 2005, Giordano *et al.* 2007, Seyssiecq *et al.* 2008). It addresses stabilization (aerobic and anaerobic digestion) and value-addition through two correlations: 1) shear stress as a function of the shear rate and; 2) viscosity as a function of the shear rate and time (Mu & Yu 2006, Brar *et al.* 2007), which in this case can describe the properties of flowability of diets.

Insect diet is constituted of synthetic or semi-synthetic nutrients from plants or animals that are required for insect nourishment (Arijs & De-Clercq 2004, Cohen 2004). Insects are able to synthesize some of the nutrients needed for their growth while others are exclusively provided by the diet (Chapman 1998). The provision of nutrients and further assimilation plays a vital role in the diet suitability for insects. Rheology in terms of viscosity and particle size can be an important parameter to define the physical composition as well as assimilation of the diets. In fact, pre-treatment can also play a key role in the rheological amelioration of the diet compositions. Pre-treatment of wastewater sludge has already been proven to be a good rheological medium for production of value-added products, such as *Bacillus thuringiensis* biopesticides and *Trichoderma sp.* based biocontrol agents (Verma *et al.* 2007). To the best of our knowledge, the rheology of the insect diets has never been investigated in literature.

Freeze-drying of agro-industrial waste is a process which allows the preservation of organoleptic factors, structure and consistent physical composition of food and other freeze-dried components for several years compared with other drying techniques (Roux 1994, Dumais 1999). In fact, freeze drying can be considered as a pre-treatment which will allow structured, fine and crushed agro-industrial waste. Grinding contributes to the production of fine particles by improving the rheology adequate for the diet and its subsequent assimilation by insects. Thus, improved rheology of agro-industrial wastes by decrease in viscosity and reduction in particle size can increase the availability of ingredients and facilitate the assimilation of the nutrients in the diets by CM larvae during breeding.

The principal objectives of this study comprised: a) determination of the viscosity of the diets and the growth of larvae during breeding; b) study of influence of particle size on growth of the

larvae; and c) establishment a correlation between the assimilation of nutrients by CM larvae, viscosity and particle size of the diets produced from agro-industrial wastes.

Materials and methods

Codling moth larvae

The eggs of codling moth, *Cydia pomonella* (L) reared in INRS-ETE laboratory (University of Quebec) were provided by BioTepp Inc. (Cap-Chat, Québec, Canada). The larvae were reared on the alternative diet, in a sterile environmental chamber.

Pre-treatment and characterization of agro-industrial wastes

The total solids concentration (TS), suspended solids (SS), C and N, proteins, carbohydrates, lipids and metals present in different agro-industrial wastes were analyzed by standard methods (APHA 2005). The composition of agro-industrial wastes is provided in Table 1. BWW and POM wastes were lyophilized (FTS Systems TM, Kinetics, USA) at $(-) 50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ to obtain dried solids. This pre-treatment was preferred to centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min followed by sterilization in autoclave (AMSCO Eagle Series on thermal 2022, Steris Canada Inc., Ontario) at $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 30 min and drying at $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 2 to 3 days. In spite of higher consumption of energy, lyophilization allowed maximum recovery of nutrients without affecting their initial state and facilitated the preservation of samples over a long period (1 or 2 years) (Roux 1994; Dumais 1999). In fact, other pre-treatments not only use high energy but also result in the loss of volatile nutrients, such as lipids (at $60 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$), proteins, carbohydrates and vitamins due to the effect of high heat during sterilization at $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$, causing problem of subsequent preservation of the samples. Prior to use, samples were crushed in the powder form for homogenization and then they were used as alternate components to replace conventional ingredients in the standard diet.

Culture media for rearing codling moth larvae

Agro-industrial wastes are non-conventional sources of nutrients (proteins, lipids and carbohydrates) which allow replacement (up to 100 % w/v of dry weight) of principal ingredients (6.85 g soya flour, 1.6 g yeast extract and 2.2 g wheat germ) in the standard diet (BioTepp Inc. diet). During the production of alternative diet, semi-synthetic ingredients, brewery industry wastewater (BWW) from La barberie (Quebec) and pomace waste (POM) from Lassonde Inc., Rougemont (Quebec), synthetic substances (0.55 g Van der Zan vitamin, 0.99 g Wesson salt mixture, 1 g sucrose) and preservatives (0.5 g ascorbic acid and 1.3 g methyl-p-hydroxy benzoate) were sterilized under UV radiation in a laminar flow chamber for 5 h, prior to being mixed in 50 ml of milli-Q water sterilized (121 ± 1 °C in autoclave) with agar to obtain 13 different diets. Mass of wastes necessary to replace ingredients in the standard diet was determined by Equation (1).

$$\frac{(\text{Ingredient mass} \times \text{nutrient concentration in ingredient})}{\text{Nutrient concentration in waste}} \quad (1)$$

The paste of the mixtures so obtained were dried in air in transparent plastic pots (50 ml) in a laminar flow chamber (Sterigard Hood, Baker Comp any Inc, Maine, US) for 2 h. Eggs (20-25) were transferred on these diets, under laminar flow chamber, and were then shifted to an environmental chamber (Ohio, USA) for breeding under optimal conditions (temperature: 25 ± 1 °C; moisture: 50 ± 0.5 %; photoperiod: 16 h; luminosity - moderate) where the hatching of eggs, development of larvae and adults was monitored daily. The egg number varied due to the small size on paraffin paper where it was difficult to perform the counting. This does not affect the statistical validity of the standard error and a deviations of the results of viability of the larvae during the experiments as each diet was independent of the other.

Diets Rheology

Study of viscosity and particle size of the diets produced from wastes will allow determination of the diet consistency to estimate quantity of nutrients assimilated by larvae for breeding.

Viscosity

Rheological behavior of waste and diets (all ingredients were mixed in 40 ml of milliQ water without agar) were studied by using a rotational viscometer Brookfield DVII PRO (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MY, the USA) equipped with Rheocalc 32 software. Two different spindles, namely, SC-34 (small sample adaptor), and ULA (ultralow centipoise adapter) were used with a sample cup volume of 18 mL/50 mL (spindle dependent).

The gaps between spindle and sample chamber were 1.235 mm for ULA (viscosity range, 1.0–30 mPa. S) and 4.830 mm for SC-34 (viscosity range, ≥ 30 mPa. S) to adapt to the floc of the analyzed diet. Brar *et al* (2008), and Pham *et al.* (2010) study had showed that these gaps of the spindles do not hinder the particle size and viscosity of the diet results during the experiments. The calibration for each spindle was carried out as per the instrument manual. The viscosity and analysis was performed by using Rheocalc V2.6 software, (B.E.A.V.I.S. – Brookfield Engineering Advanced Viscometer Instruction Set). Different rheological models were considered using the viscosity input information as follows:

$$\text{Bingham Plastic } \tau = \tau_0 + \mu_p \gamma \quad (2)$$

$$\text{Casson Law } \sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\mu_p \gamma} \quad (3)$$

$$\text{NCA/CMA Casson } (1 + a)\sqrt{\tau} = 2\sqrt{\tau_0} + (1 + a)\sqrt{\eta \gamma} \quad (4)$$

$$\text{IPC Paste } \eta = kR^n \quad (5)$$

$$\text{Power Law } \tau = k \gamma^n \quad (6)$$

Viscosity and shear stress diet profiles were studied as a function of shear rate and time at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ to estimate the parameters of codling moth breeding for various diets. Normally, the viscosity refers to apparent viscosity in the centre study.

Particle size analysis

Particle size was determined by using Fritsch Laser particle sizer analysette 22, which was based on laser diffraction principles. During the entire analysis, ultrasound function was switched off avoid the breakage of sample particles. The rotor speed and the recirculation pump of water were maintained between 250 and 500 rpm, to minimize the particle break-up.

For measurement, a drop of sample diet was diluted and analyzed in triplicates. This method was based on the principle of Fraunhofer diffraction and Mie scattering. The results obtained for average distribution of particle size were reported as percentage of volume of particles in 51 discrete particles range between 0.1 - 1000 μm . Floc disruption at D_{43} analogous to the particle size expressed as diameter 43 % size distribution cut-off points was chosen as average particle size as it showed the volume median diameter. Standard deviation of particle size measurement was 10 to 12 %.

Biological parameters

The rate of hatching makes it possible to evaluate the number of hatched eggs (clear beige color) relative to the total number of eggs present on the waxed sheet. The eggs that were not hatched show a beige color with a black spot. The rate of final hatching (%) was calculated by the following Equation:

$$\frac{(N_{be} \times 100)}{N_{bt}} \quad (7)$$

N_{be} = number of eggs that are hatched;

N_{bt} = total eggs

The adults of codling moth collected from the diets were counted and weighed 24 h after conservation at $4 \pm 1^\circ \text{C}$. After weighing, the adults were laid out in a plastic container (17 x 14.5 cm, perforated with 3 small holes) where the adults were mated in nuptial coupling (females were larger than males due to their abdomen size). The number of eggs spread out over the plastic film on the diet was counted daily.

The hatching (Eq.8) was estimated by calculating the ratio of number of hatched eggs obtained to total number of initial eggs in the diet. Growth (Eq.9) was estimated by the number of larvae obtained to total number of hatched eggs. The fertility (Eq.10) was estimated by calculating the

female adults obtained on the total number of laid eggs. These ratios allowed determination of the efficiency of the diets for breeding represented by the respective Equations as follows:

$$\text{Hatching} = \frac{\text{Neonatal larvae}}{\text{Total eggs}} \quad (8)$$

$$\text{Growth} = \frac{\text{Larvae adults}}{\text{Hatched eggs}} \quad (9)$$

$$\text{Fertility} = \frac{\text{Hatched eggs}}{\text{Females adults}} \quad (10)$$

Statistical analyses

For calculation of significant differences and standard errors during analyses, Turkey-Kramer test was used. Database was subject to an analysis of variance (ANOVA). The values $p < 0.05$ were considered as significant.

Results and discussion

Selection and characteristics of agro-industrial wastes

Agro-industrial wastes used for the development of different diets was characterized and the data is presented in Table 1. The data shows a composition rich in nutrients (C_t , N_{org} , proteins, carbohydrates, lipids and micronutrients). These wastes do not present risks to the environment and codling moth due to low concentration of different contaminants in particular heavy metals (Cd and Pb) and coagulants (Al and Fe) which can be toxic at high concentrations (MENV 2004, Perron & Hébert 2007). In fact, Montgomery *et al.* (2004) has shown that agro-industrial waste, as such can be used as supplement for nourishing the animals. Ingredients (soya flour, wheat germ and yeast extract) were substituted by wastes which were already used in previous studies (Brar *et al.* 2009) for production of diets as nutrient source for the growth of codling moth larvae and other lepidoptera.

Rheological profiles

Figure 1a and b presents rheogram and evolution of viscosity as a function of time, for brewery waste water and pomace waste, respectively. The apparent viscosity of the analyzed diets decreased as a whole, from 0 to 60 minutes. The decrease in viscosity demonstrated non-Newtonian behavior of the diets.

Figure 1a showed that the overall viscosity of the diets produced using BWW was higher than that of the diets produced using apple pomace (Fig. 1b). Among the diets containing BWW, the diets produced using replacement of more than one ingredient by BWW led to higher viscosity varying from 1649 to 1049 mPa.s in 60 min (Figure 1a). The other diets where BWW replaced just one ingredient, the increase in viscosity were lower than the previous diets decrease (from 1649 to 1079 mPa.s after 30 seconds with 1049 mPa.s to 449 mPa.s after 60 mins). Thus, the viscosity of all diets was higher, when the diet was composed of only one ingredient and required large quantity of wastes, BWW (or POM) to replace the other two ingredients. For example, the diet BWW+YE were found to possess higher viscosity (1649 mPa.s after 30 s with 1049 mPa.s after 60 mins). Nevertheless, the BWW+POM diets provided to higher viscosity varying from 1800 to 1089.51 mPa.s in 60 mins for combination all diet. And the case was reversed, in the case of the diets which comprised two ingredients and especially in the case of

wastes necessary to replace only one ingredient. The increase in viscosity was also due to the increase in concentration in total solids (66.5 ± 6 g/L) for BWW which replaced the diet ingredients in sufficient quantity of these diets are presented in table 2. The viscosity of the diet also increased in the decreasing order, of the following ingredients: soya flour (role as water absorbant), wheat germ (role of thickener) and yeast extract (smaller quantity and easily dissolve in solution).

Figure 1b showed that the viscosity of the diets containing POM decreased more rapidly after 30 seconds from 1529.77 to 1189 mPa.s and after 60 minutes from 789.80 to 519 mPa.s) as compared to the diets containing BWW. Viscosity of the six diets were lower than that of the POM+BWW diet and much higher than that of the control diet (100 mPa.s after 30 sec with 15 mPa.s after 60 min) which remained lower due to small particle size, and homogeneity of the ingredients which constitute the diets, as discussed later.

The rapid decrease in the viscosity of the diets containing POM was related to the homogeneity of the diet and also the property of sedimentation which leads to decantation. On the other hand, the diets containing BWW of heterogeneous composition (yeast, malt, hop, maize and fruits), behave as water absorbent while providing an optimal density to obtain a diet, nutritious for larval breeding.

Thus, higher the viscosity, lower was the assimilation rate of nutrients by the larvae. This was the case of diets BWW+POM, BWW+YE, BWW+SF and POM+ YE with higher viscosity (above 1000 mPa.s). Diets having low viscosities (below 1000 mPa.s) provided excellent results for rearing of codling moth larvae as seen in Fig.1 (1a, 1b, 1c and 1d) and Fig. 4.

Shear-thinning behaviour

Figure 2 (a and b) and (c and d) presents the rheogram comprising shear stress and apparent viscosity of diets as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$) for brewery wastewater and pomace waste, respectively.

Figure 2 showed that the diets produced using BWW wastes showed higher viscosity (from 1899.5 to 207.23 mPa.s) and higher shear stress (from 0.08 to 4.18 Pa) compared to the diets produced using pomace wastes which resulted in lower viscosity (from 129.9 to 109.5 mPa.s) and lower shear stress (from 0.03 to 0.05 Pa at shear rate of 0.4 s^{-1} and 0.08 to 0.18 Pa after 200 s^{-1}).

Figures 2a and b demonstrated that the diet, BWV+YE provided higher viscosity (which decreased from 1099 to 207.23 mPa.s after attaining a shear rate of 201.80 s^{-1}) and increased shear stress from 0 to 4.18 Pa. On the other hand, lower viscosity (decrease from 889.79 to 71.26 mPa.s) and lower shear stress (increase from 0.04 to 1.32 Pa at shear rate of 200 s^{-1}) was provided by the diet POM+WG+SF as seen in Fig. 2c and 2d. This was explained by the fact that the quantity of POM necessary to replace the soya flour (6.85 g) was more important than the POM utilized to replace other ingredients in the diet. Nevertheless, YE dissolved perfectly in solution and the quantity of WG and BWV required to replace the soya flour made it possible that the diet BWV+WG+SF possessed viscosity close to the control diet and provided excellent results. The shear stress (increased slowly from 0.01 Pa to 0.084 Pa at shear rate of 183.5 s^{-1}) and viscosity (slight reduction from 99.9 mPa.s to 24.55 mPa.s at shear rate of 200 s^{-1}) for the control diets lower taking into account the improved conditions to crush and homogenize the ingredients in the industry. The profiles of viscosity and shear stress of the diets was also related to the high quantity required as related to the higher total solids concentration in BWV (66.5 g/l for BWV and 45 g/l for POM) which provided an important mass to the diets containing BWV, compared with the diets containing POM as presented in table 2. Thus, diets POM+WG+YE, BWV+WG+YE and POM+SF+WG showed lower viscosity and shear stress, which provided excellent results for larval growth. As the viscosity of the diets decreased, nutrient assimilation by the larvae was enhanced and breeding rate was higher.

The relation between shear stress (τ) and shear rate ($\dot{\gamma}$) was not linear, showing a non - Newtonian behavior for the diets. The diets containing BWV (Fig. 2a and b) demonstrated a non-Newtonian behavior for viscosity and pseudoplastic profile for the diets containing POM and BWV. The results of Figs. 2a, 2b, 2c and 2d were in concordance with Table 2 observations which confirmed that higher viscosity of the diet was due to increased total solids concentration (TS). Pham et al. (2010) also established that higher TS concentration (25 g/L to 40 g/L) resulted higher viscosity and shear stress. For concentrations of TS lower than 100 g/L, apparent viscosity decreased rapidly, as samples were less dense comprising lower solids concentration and eventually became more fluid. Thus, lower viscosity was a favorable phenomenon for the assimilation of nutrients and subsequent larval growth. Despite higher viscosity and shear stress of the diet where the wastes replaced 2 ingredients, the breeding results of larvae were quite encouraging which may be due to the possibility of enhancement of nutrients. Thus, rheology along with other parameters plays a pivotal role in diet preparation.

Rheological models

Table 3 demonstrates various rheological models with varying degree of confidence of fits for the diets produced. In the lower shear rate region ($0 - 200 \text{ s}^{-1}$), Bingham, Casson and NCA/CMA Casson (modified Casson) showed corresponding confidence of fit of 46 to 96 (%) and 64 to 97 (%). This decrease was higher for diets which had lower TS ($\leq 100 \text{ g/L}$). These results were contrary to the study of Pham *et al.* (2010), which showed the confidence of fits increasing from 72.1 to 97.2 % for sludge at 25 g/L TS. The yield stress of model and plastic viscosity was higher for diets which showed higher TS, although the power model of IPC can characterize the fluidity of all diets with TS in the range from 60 to 200 g/L. Power model with the fluid parameters, K (consistency index) and n (flow behavior index) for the diets is shown in Table 3. The diets, with lower concentration of TS 100 g/L, possessed high k values below 100 mPas. Thus, the diet flow decreased with the increase of viscosity ($> 100 \text{ mPa s}^{-1}$). The TS increased leading to increase in consistency of the diet and increases the degree of interaction between the particles of diets (Brar *et al.* 2008). This reduced the fluidity and consistence of diet which was difficult to be consumed by larvae. Thus, the flow behaviour index (n) decreased for diets having higher TS, and showed a decrease in shear-thinning behaviour. The variations in the two rheological parameters indicated stronger non - Newtonian behaviour more important for diets with BWW and a high pseudoplasticity which aimed towards the stability, and which decreased with the decline of TS. The consistency index, K , varied from 42.4 to 1188, 25.6 to 620.4 and 52.5 to 317.9 and flow behaviour index, n , changed from 0.5 to 0.35, 0.62 to 0.55 and 0.63 to 0.58, respectively, for diets BWW+POM, BWW+YE, POM+YE of TS 104 - 240 g/L. During the interactions occurring in the diets, the breakage of liaisons between particles facilitated (K for diets with pomace were lower than that of diets with BWW) and increased (the values of n are more raised for diets with pomace than for diets with BWW) the flow of diets. These K and n improved the quality of diet and facilitated larvae breeding.

Change in particle size distribution

Particle size is the second important parameter which influenced the assimilation of nutrients by larvae. Larger the particles, poorer is the assimilation by larvae leading to ineffective breeding of larvae. Figure 3a and 3b present the volume distribution of particle size of diets according frequency $dQ(x)$ for brewery wastewater and pomace, respectively.

The volume distribution of particle size (4.7 % POM+YE, 4.7 POM+WG, 4.2 POM+SF+YE and 4.2 % BWW+POM) for POM was higher than the particle size (1, 200, 400 and 950 μm) for the diets produced with BWW (6 % BWW+YE and 3.4 BWW+SF+YE) and CONTROL diet (3.2 %). Generally, the volume occupied by small particles decreased with the increase of TS concentration of diets and agro-industrial waste, and vice versa for the volume occupied by large particles which was the case in POM. The profile was attributed to the increase of solids concentration caused by change of interactions between particles (Houghton *et al.* 2002, Feng *et al.* 2009) in the network of particle sizes of the wastes and the diets.

The frequency distribution observed was less important than those of the diets produced using pomace (Fig. 3b), although the majority of the diets showed peaks averaging to 1, 200 and 900 μm , 3 peaks (1, 4.7 and 4.2 %) pertaining to diets POM+WG, POM+SF+YE and POM+YE due to the concentration, density and viscosity of the waste and ingredients of SF and WG present in these diets.

The higher particle sizes for the diets containing POM were not in conformity with shear stress and viscosity which was higher for the diets containing BWW (Figs 1a, 1b, 2a and 2b). This may be due to the fact that as the volume fraction of solids in the system goes up; the particles become more closely packed together; and it becomes more difficult for them to move freely. Further, particle-particle interactions increase; and resistance to flow (viscosity) increases which was the case in BWW. As the volume fraction approached maximum value, viscosity increased, but very steeply. Volume fraction not only influences the absolute value of viscosity, but it also affects the nature of the relationship between shear rate and viscosity for the system flow behavior. Increasing volume fraction led to shear-thinning behavior in the case of BWW. Thus, the frequency distribution of BWW diets was more towards the smaller particle size, and was favorable for the assimilation of the nutrients by the larvae.

Viscosity and particle size effect of diets on larva growth

Figure 4 depicts the effects of viscosity and, particle size on different breeding parameters of codling moth on the diet.

The average particle size (D_{43}) was higher for diets BWW+WG (867 μm), POM+YE (602.98 μm) and POM+WG+SF (674.4 μm), resulting in poor ratio of growth in terms of fecundity (laying of eggs), larvae and adults. The other diets which possessed average particle size near to that of the control diet provided excellent results during breeding of larvae. These observations made it

possible to confirm that higher the particle size of the diets, lower the ratio larvae/eggs, adults/larvae and eggs/females and thus the diet was less effective for the growth of codling moth larvae. On the other hand, certain diets (BWW+YE; BWW+WG+YE and POM+SF) were an exception in which the average particle size was close to that of the control diets (100 μm) where ratio of growth of larvae and adults was not very satisfactory (≤ 0.5) which was difficult to explain out this after.

Figure 5 demonstrated that the diets possessing lower particle size and lower viscosity resulted in enhanced assimilation of the nutrients (proteins, carbohydrates and lipids) by the larvae and hence increased efficiency of these diets. This was the case for the diets BWW+WG+SF (0.7 g of lipids; 1.6 g of carbohydrates and 1.7 g of proteins) and POM+WG+SF (0.65 g of lipids; 1.1 g of carbohydrate and 1.6 g proteins). On the other hand, certain diets, such as BWW+WG and POM+WG+YE possessing nutrients closer to the control diet, showed particle size 3 to 4 times higher than that of the control diet taking into account enormous quantity of the wastes incorporated, which also increased its viscosity. Thus, these diets were not found to be favorable for breeding of larvae.

The components which improved bioavailability, stability and flavor of nutrients, facilitated the ingestion and digestion of produced diets. Cohen (2003) has already discussed that the components of diet can modify bioavailability, stability and flavor of nutrients by changing hydro colloid nature, which can be linked to physical consistency (viscosity, shear stress and particle size) as confirmed in this study.

Conclusions

Rheology study of diets produced using brewery waste water (BWW) and pomace waste (POM) as substitute of certain ingredients (soya flour, wheat germ and yeast extract) allowed the possibility of a correlation between the viscosity, particle size and larva growth:

1. The rheological characterization of agro-industrial wastes confirmed that brewery wastewater diet provided higher viscosity (decrease to 1899 at 207 mPa.s), total solids (178.3 ± 16 in 206.92 ± 28 g/L) as compared to pomace;
2. The significant diminution of apparent viscosity of diets in a shorter time can degrade the available nutrients and reduce the growth of larvae;
3. The viscosity was higher (207 - 1899 mPa. s) for brewery waste diets having higher totals solids (178.3 ± 16 in 206.92 ± 28 g/L);
4. - Lower particle size of BWW diets result in higher nutrient assimilation by larvae as compared to the pomace diet;
5. Brewery wastewater given excellent results of breedly of codling moth larvae such as: rate of hatching (78.8 %), percentage growth of larvae (> 50 %) and fertility rate (33 %).

Acknowledgements

The authors are sincerely thankful to the natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, Canada Research chair), INRS-ETE and FQRNT (ENC) for financial support. We are grateful to BioTepp Inc. for providing us codling moth eggs for the research experiments. Thanks are also due to ADM-Ogilvie, la Barberie and Lassonde Inc. for providing us the wastes to perform the studies. The views and opinions expressed in this article are those of authors.

List of abbreviations

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BWW	Brewery wastewater
CM	Codling moth
CpGV	<i>Cydia pomonella granulovirus</i>
ICP	Institute for Interconnecting and Packaging Electronic Circuits
MENV	Ministère de l'Environnement
N.org	Organic nitrogen
POM	Pomace waste
SF	Soya flour
SS	Suspended solids
TS	Total solids
WG	Wheat germ
% w/v	Weight per unit volume
YE	Yeast extract
BWW+SF	Yeast extract and wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+WG	Soya flour and yeast extract substituted by brewery wastewater
BWW+YE	Soya flour and wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+SF+YE	Wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+WG+YE	Soya flour substituted by brewery wastewater
BWW+SF+WG	Yeast extract substituted by brewery wastewater
BWW+POM	Wheat germ, soya flour and yeast extract substituted by brewery wastewater and pomace waste
Control	Control diet derived from Biotep Inc
POM + SF	Yeast extract and wheat germ substituted by pomace waste
POM + WG	Soya flour and yeast extract substituted by pomace waste
POM + YE	Soya flour and wheat germ substituted by pomace waste
POM+SF+YE	Wheat germ substituted by pomace waste
POM+WG+YE	Total solids
POM+SF+WG	Soya flour substituted by pomace waste
	Yeast extract substituted by pomace waste

Symbols

C_a, P_a, L_a	Carbohydrates; Proteins and Lipids present in the diet assimilated
τ	shear stress (mPa)
τ_0	yield stress (shear stress at 0 rpm of spindle, mPa)
γ	shear rate (s^{-1})
k	consistency index ($mPa \cdot s^n$)
n	flow behaviour index (dimensionless)
μ_p	plastic viscosity ($mPa \cdot s$)
R	rotational speed (rpm)

References

- Abu-Orf MM & Örmeci B (2005) Measuring sludge network strength using rheology and relation to dewaterability, filtration, and thickening—Laboratory and full-scale experiments. *Journal of Environmental Engineering* 131 (8): 1139-1146.
- APHA, AWWA & WEF (2005) Standard methods for the examination of water and. *Wastewater*, 21st Edition.
- Arijs y & De-Clercq P (2004) Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *BioControl* 49: 505–516.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR & Surampalli RY (2007). *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies. *Chemosphere* 67: 674–683.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Surampalli RY & Valéro JR (2008) Particle size variations during production of wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* biopesticides, *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioactive. Waste Manage.* 12 (1): 30–39.
- Brar SK, Verma M, Valero JR, Tyagi RD & Surampalli RY (2009) Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2849–2857.
- Chapman RF (1998) *The Insects: Structure and Function*. 4th edition UK. *Cambridge University Press.*: 770 pp.
- Cohen AC (2003) *Insect diet science and technology*. *CRC press. W. D.C* : 429 pp.
- Cohen C (2004). *Insect diet- Science and Technologi*y. *CRC Press, US* : 293 pp.
- Dumais O (1999) *La gastronomie en plein air*, Québec Amérique, Montréal: p 148-149.
- Feng X, Lei H, Dengb J, Yua Q & Li H (2009) Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically. *Chemical Engineering and Processing* 48: 187–194.
- Flemming HC & Wingender J (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43 (6): 1–8.
- Giordano C, Pollice A, Laera G, Saturno D & Mininni G (2007) Influence of solid retention time on the rheology of MBR sludge. *Water Sci. Technol.* 56 (8): 151–159.
- Gonze E, Pillot S, Valette E, Gonthier Y & Bernis A (2003). Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor. *Chemical Engineering and Processing* 42: 965-975.
- Houghton JI, Burgess JE & Stephenson T (2002) Off-line particle size analysis of digested sludge. *Water Res.* 36: 4643–4647.
- MENV (2004) Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes. Critères de référence et normes réglementaires. *Ministère de l'Environnement, Québec* : 127 p.
- Montgomery R. (2004) Development of biobased products. *Biores Technol* 91: 1–29.

- Mu Y & Yu HQ (2006) Rheological and fractal characteristics of granular sludge in an upflow anaerobic reactor. *Water Res.* 40: 3596 – 3602.
- Perron V & Hébert M (2007) Caractérisation des boues d'épuration municipales – Partie I: Paramètres agronomiques. *VECTEUR environnement* 40 (4): 48-52.
- Pham TTH, Brar SK, Tyagi RD & Surampalli RY (2010) Influence of ultrasonication and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrasonics Sonochemistry* 17 (1): 38-45.
- Roux J-L (1994) Conserver les aliments, Comparaison des méthodes et des technologies des aliments. *Technique et Documentation – Lavoisier* : p 436-456.
- Seyssiecq B, Marrot D & Djerroud N (2008) Roche, In situ triphasic rheological characterisation of activated sludge, in an aerated bioreactor. *Chem. Engng. J.* 142: 40-47.
- Verma M., Brar SK, Riopel AR, Tyagi RD & Surampalli RY (2007) Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study. *Environ. Technol.* 28: 273–284.

Table 2.2.1: Physico-chemical characterization of different agro-industrial wastes

Parameters	Brewery wastewater	Apple pomace
pH±0,1	4.45	3.3
TS (g/L)	66.5±6	45±5
SS (g/L)	26.5±4	15.5±2
C (g/L)	33.22±3.5	13.5 ± 0.6
N _{org} (g/L)	2.7±0.12	1.8 ± 0.2
Protein (g/L)	16.9 ± 2.1	11.25 ±1.3
Carbohydrate (g/L)	25.5±5.5	22±1.3
Lipid (g/L)	6±1.6	2±0.2
Micronutrients (mg/Kg)		
As (13 – 40) [†]	0.04±0.01	nd
Ca	3529.25±560	912.2±58
Co (34- 150) [†]	0.026	0.021
Cr (210 - 1060) [†]	1.2±0.02	0.57±0.03
Cu (400 - 1000) [†]	14.622±0.5	13.4±1.2
K	3407.5±510	6825.25±302
Mg	1907.13±35	721.92±64
Mn	9.4±0.3	12.22±3.2
Mo (5 – 20) [†]	3.96±0.03	1.85±0.02
Na	305.14±11	405.2±32
Ni (62 – 180) [†]	2.1±0.03	2.408±0.05
P	9503.17±230	3925.17±135
S	3092.15±270	2423±157
Se (2 – 14) [†]	2.5±0.21	0.1±0.04
Si	2.22±0.23	3.32±0.14
Zn (700 – 1850) [†]	41.07±5.5	18.1±2.5
Cd (3 - 10) [†]	0.05±0.02	0.02±0.01
Pb (150 – 300) [†]	0.14±0.03	0.3±0.02
Al	364.8±7.3	259.43±5.2
Fe	68.87±3.1	333.13±45

nd : not detectable

mg/kg (dry weight)

± : refers to standard error

[†]Restricted concentration norms for wastewater sludge in Quebec (MENV, 2004)

Table 2.2.2: Total solids concentration of different diets incorporating agro-industrial wastes

Diets	Total solids - TS (g/L)
control	93±12
bww+pom	206.92±24
bww+ye	178.32±16
bww+sf	162.08±11
bww+wg	174.28±18
bww+sf+ye	165.68±23
bww+ye+wg	150.32±21
bww+wg+sf	149.6±28
pom+sf	154.92±27
pom+ye	175.88±10
pom+wg	162.28±31
pom+sf+ye	142.12±22
pom+ye+wg	139.24±25
pom+wg+sf	130.9±18

±: refers to standard error during analysis.

Table 2.2.3: Rheological models of diets produced using agro-industrial wastes

Wastes	Brewery wastewater (BWW)							Apple pomace (POM)						
Diets	contr ol	bww+ wg	bww+ sf	bww+ ye	bww+w g+sf	bww+ wg+ye	bww+s f+ye	pom+w g	pom+ sf	pom+ ye	pom+w g+sf	pom+wg+ ye	pom+ye +sf	pom+b ww
Bingham Law														
Plastic viscosity ($\eta, 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	0.04	1.43	1.64	1.37	1.27	2.01	0.65	0.68	0.62	0.4	0.56	0.55	0.72	2.04
Yield stress ($\tau_0, 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.06	0.00	0.02	0.04	0.06	0.03	0.03	0.05	0.09
Confidence of fit (%)	24.2	61.5	62.1	73.3	76.1	61	93.3	92.2	92.5	89.6	60.5	95.1	85.1	46.3
Casson Law														
Plastic viscosity ($\eta, 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	0.24	1.18	1.35	1.1	0.97	1.59	0.55	0.42	0.3	0.09	0.37	0.25	0.37	1.46
Yield stress ($\tau_0, 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.0	0.01	0.02	0.05	0.01	0.02	0.03	0.03
Confidence of fit (%)	63.2	88.8	89.3	93.5	93.6	87.4	91.6	94.3	97.0	85.9	81.9	95.5	93.5	77.3
Power Law														
Consistency index (mPas)	4.39	11.4	13.6	15	10.7	8.7	6.89	7.5	7.0	7.9	6.8	5.7	6.2	21.1
Flow index	0.97	0.61	0.60	0.58	0.64	0.65	0.68	0.64	0.66	0.61	0.70	0.78	0.73	0.35
Confidence of fit (%)	84.9	94.9	94.5	93.2	92.7	95.4	82.4	85.7	89.0	80.0	96.0	87.1	95.1	93.7
IPC Paste														
Shear sensitivity factor (n_s)	1.48	0.33	0.33	0.35	0.4	0.36	0.32	0.56	0.67	0.87	0.47	4.00	0.64	0.41
10 rpm viscosity (η_{10})	0.43	3.69	4.21	3.56	3.87	5.89	1.3	2.99	4.29	6.07	2.47	0.69	5.11	7.62
Confidence of fit (%)	84.9	94.9	94.5	93.2	92.7	95.4	82.4	85.7	89.0	80.0	96	87.1	95.1	93.7

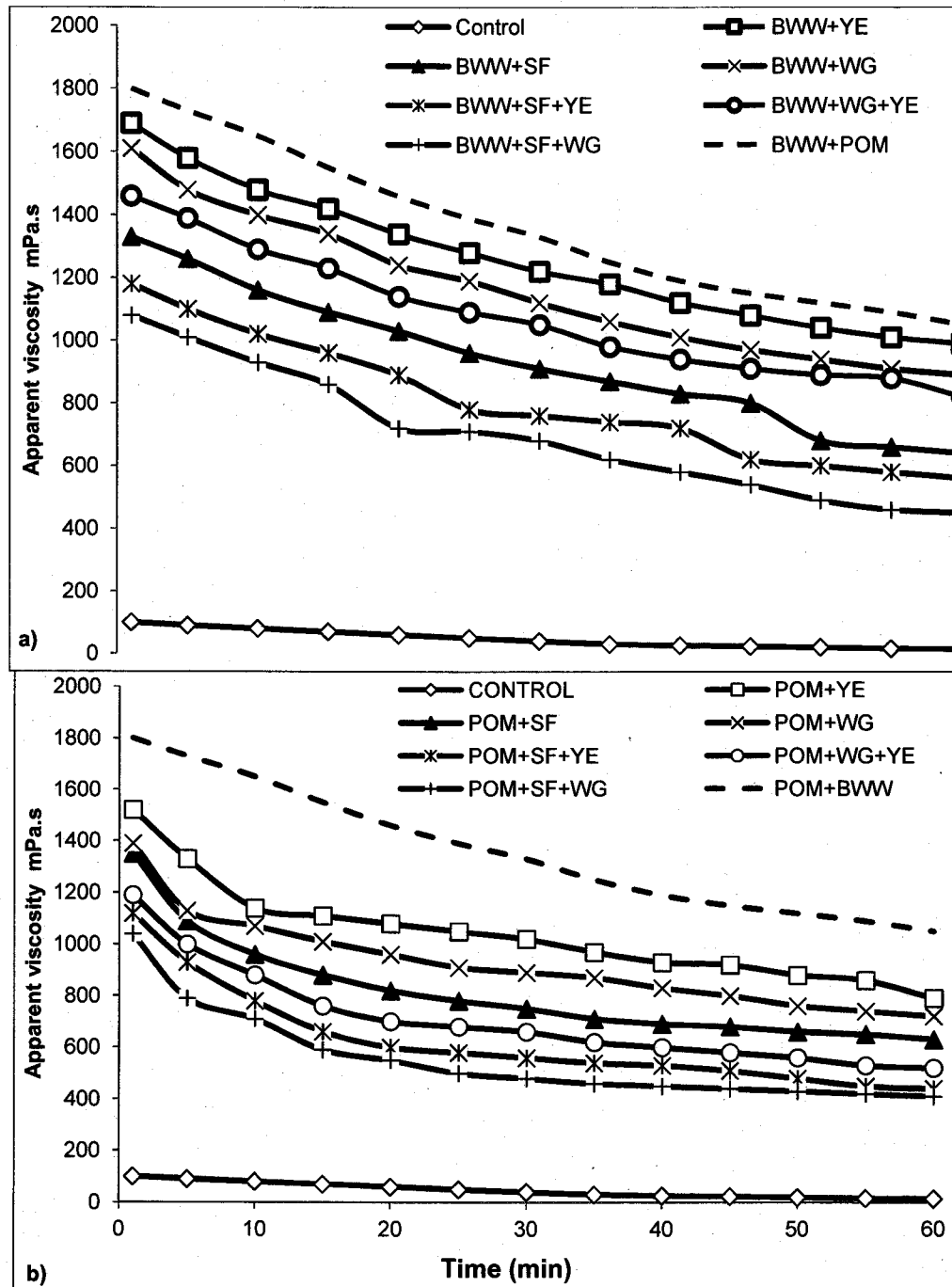


Figure 2.2.1: Viscosity time profile of diets produced using: (a) brewery waste water; and (b) pomace waste

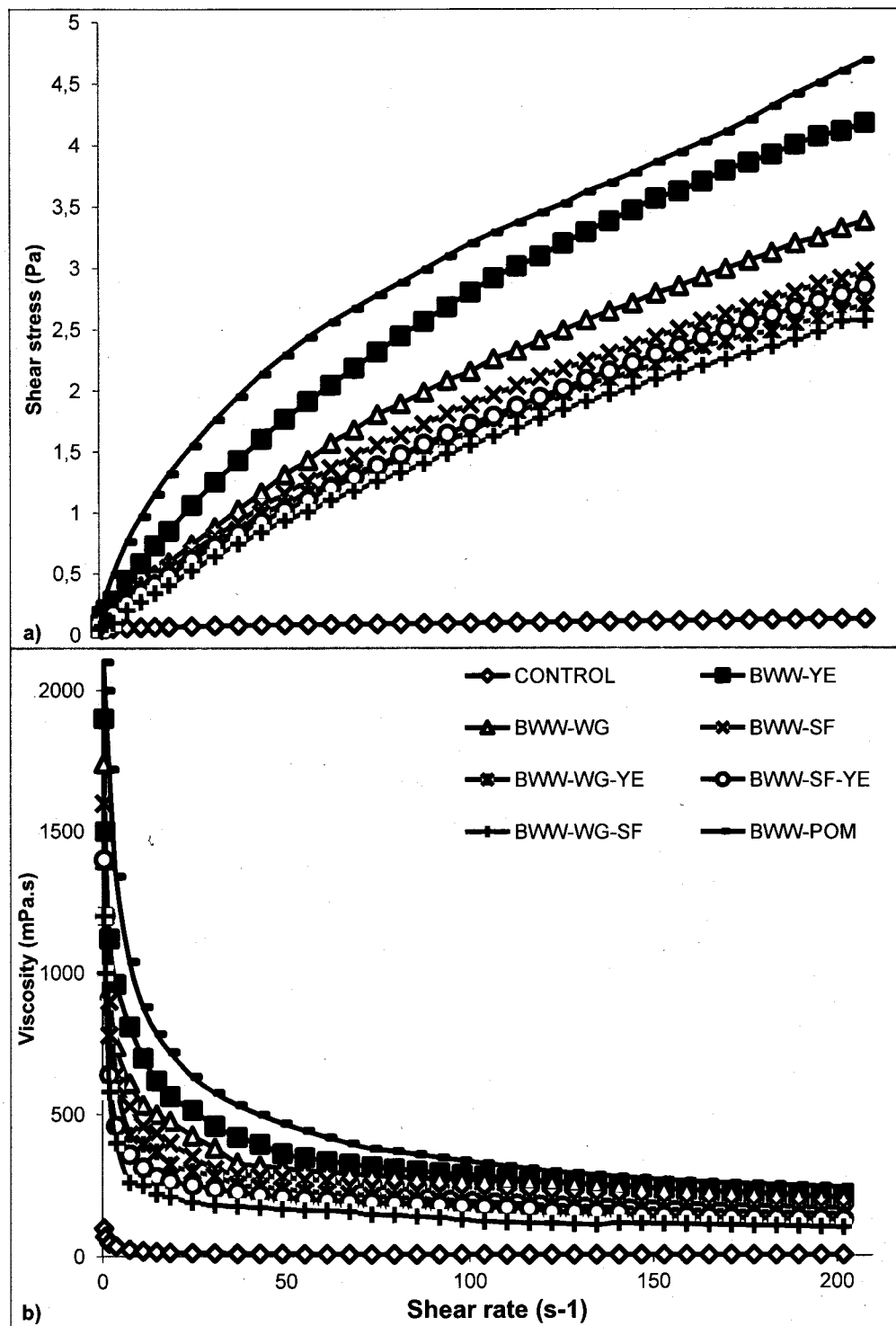


Figure 2.2.2: Shear stress (a) and viscosity (b) profile as function of shear rate of diets produced using brewery wastewater

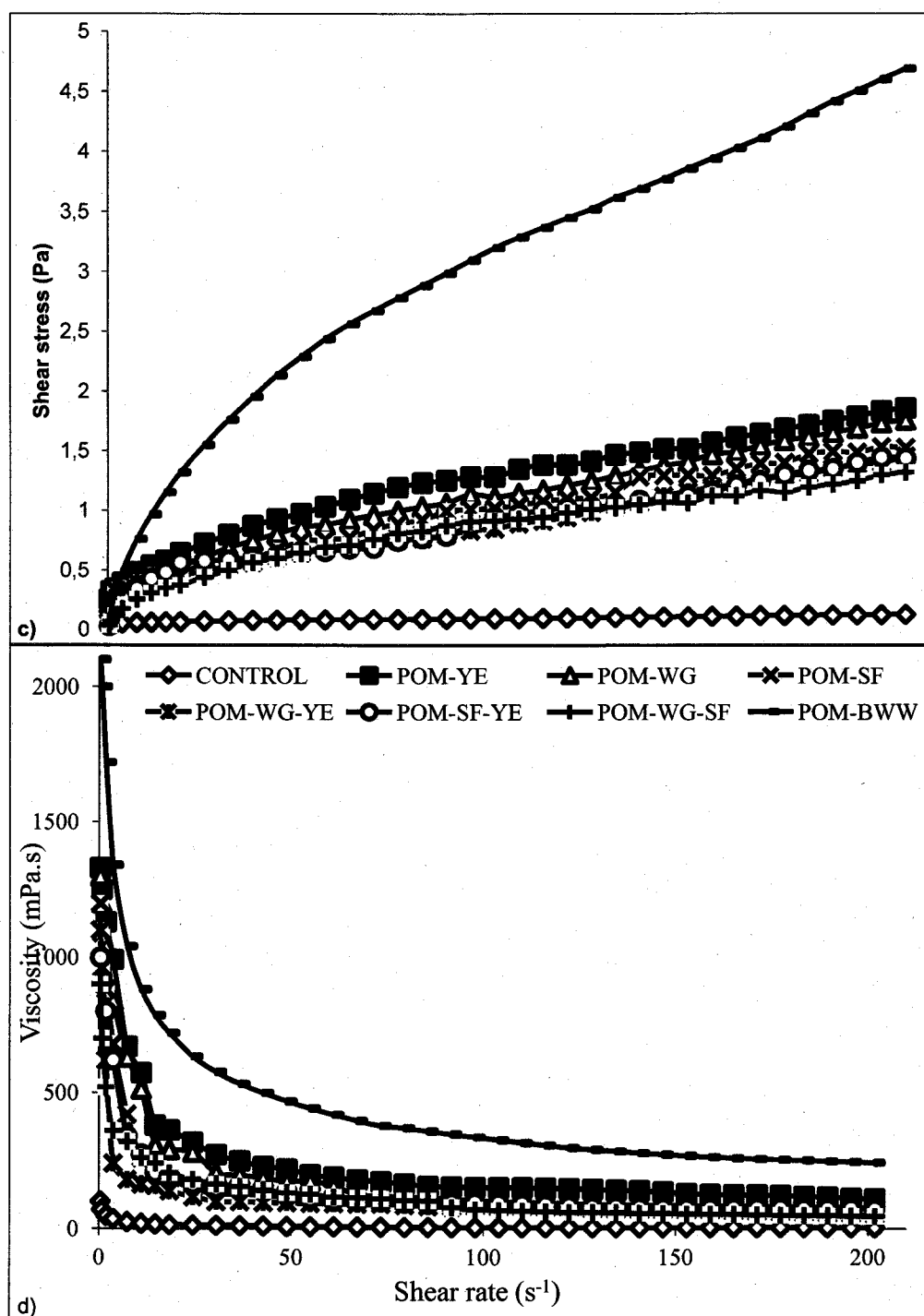


Figure 2.2.2: (follow-up) Shear stress (c) and viscosity (d) profile as function of shear rate of diets produced using pomace waste

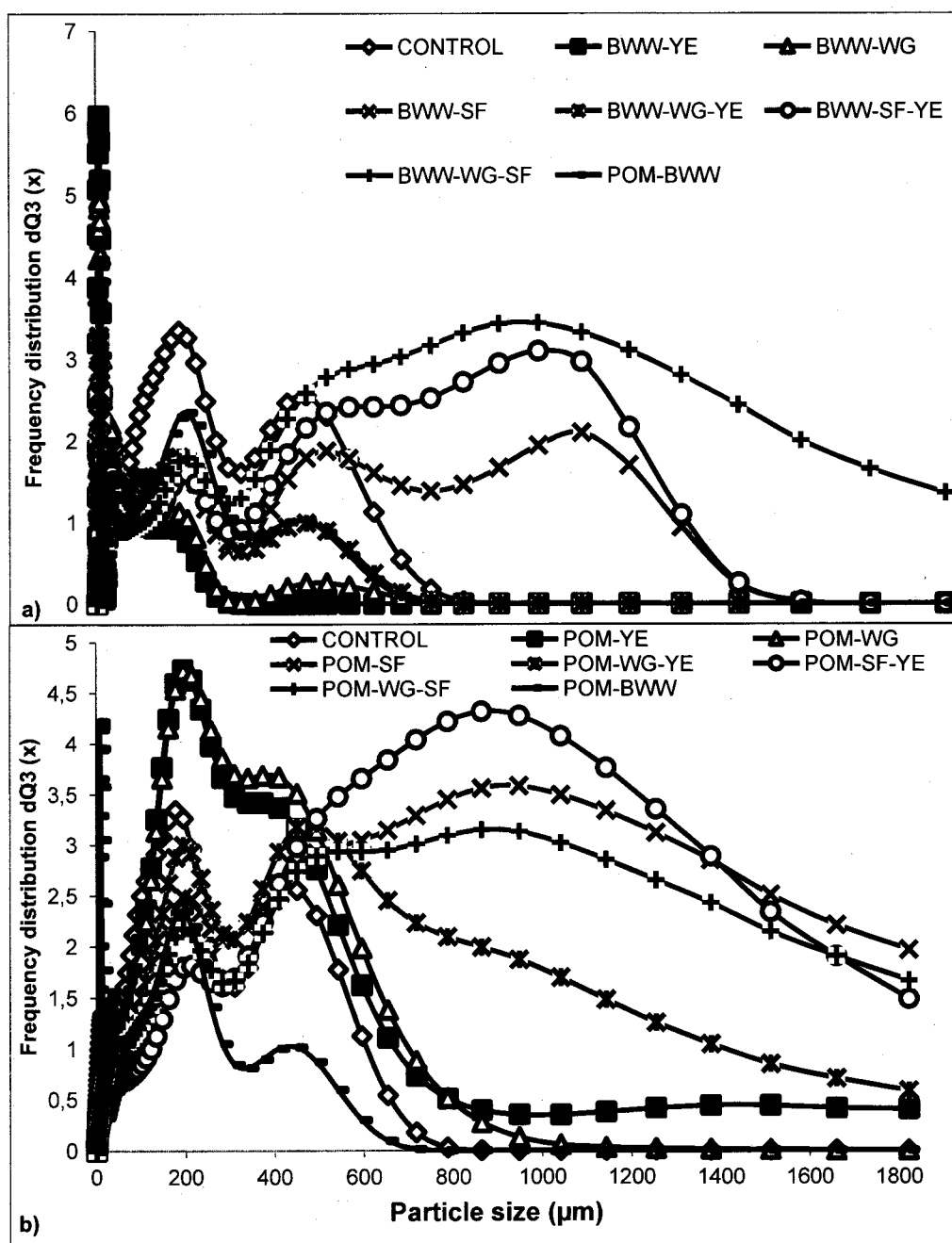


Figure 2.2.3: Frequency distribution $dQ3(x)$ as a function of particle size of diets produced using brewery wastewater (a); and diets produced using pomace wastewater (b)

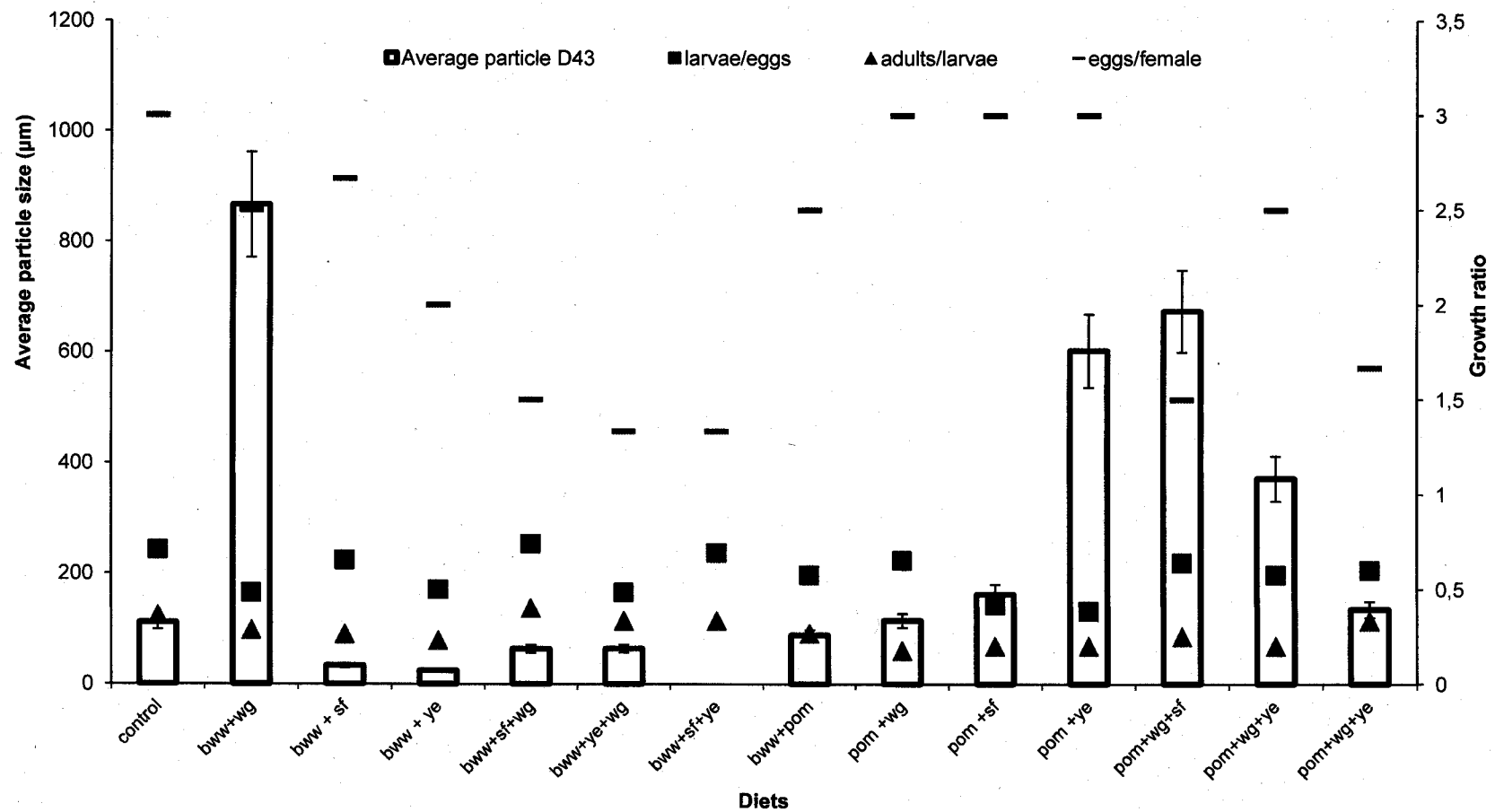


Figure 2.2.4: Breeding ratios (larvae / eggs; adult / larvae; eggs / female) of different diets in relation to particle size

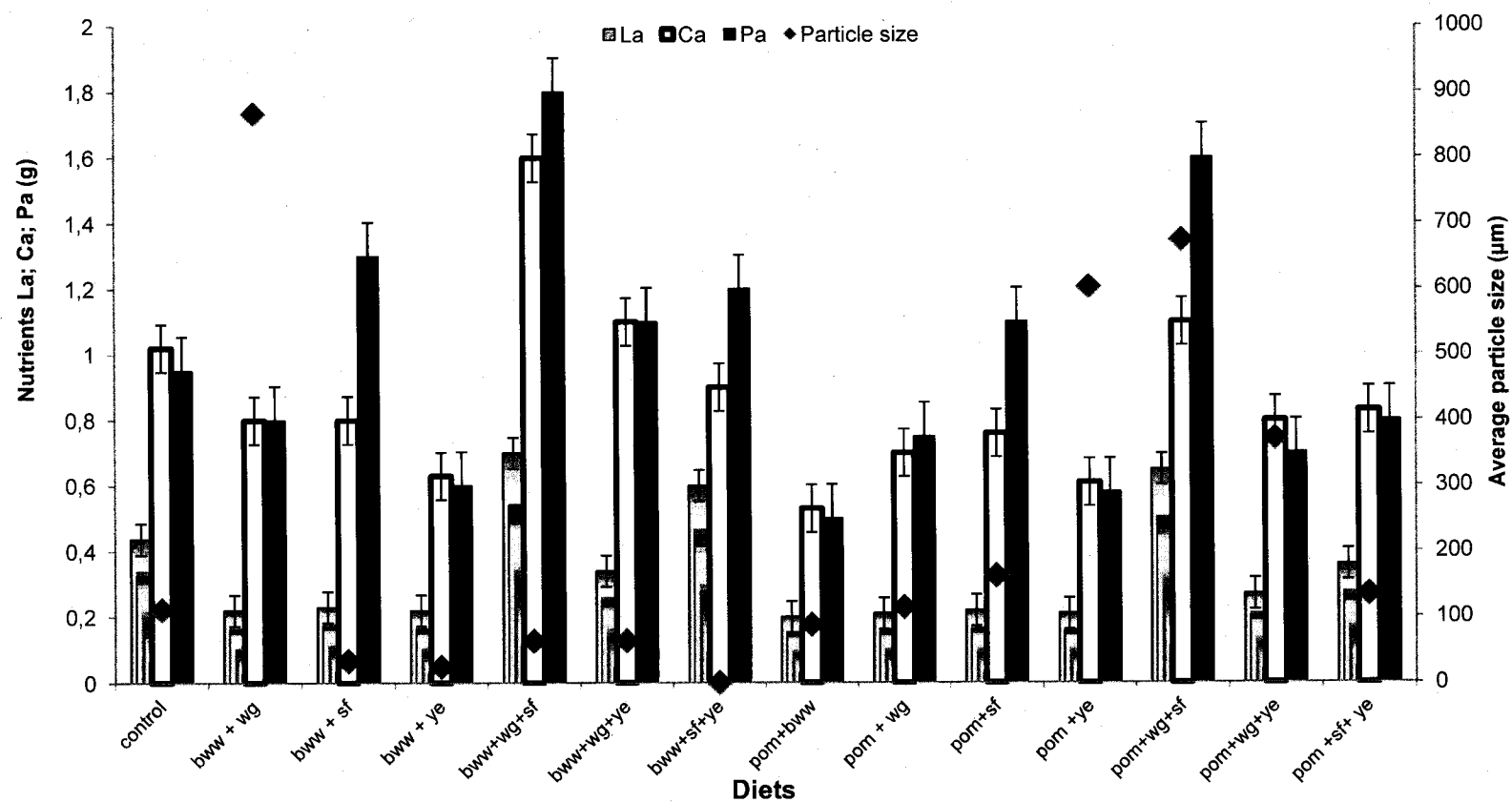


Figure 2.2.5: Assimilated nutrients (proteins, lipids and carbohydrates) profile for larvae codling moth grown on different diets as a function of particle size

CHAPITRE II - PARTIE 3

STATISTICAL OPTIMIZATION OF AGRO-INDUSTRIAL DIETS FOR REARING OF *CYDIA POMONELLA* BY REPOSE SURFACE METHODOLOGY

*OPTIMISATION STATISTIQUE DES DIÈTES À BASE DE REJETS
AGROINDUSTRIELS POUR L'ÉLEVAGE DE CYDIA POMONELLA PAR
LA MÉTHODOLOGIE DES RÉPONSES EN SURFACE*

J. R. Gnepe¹, S. K. Brar¹, R.D. Tyagi^{1*}, J.R. Valero¹

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

Agronomy Research journal (2011) 9 (1-2), 281-297

RÉSUMÉ

Dans cette étude, les eaux usées de pomme et de micro-brasseries ont été utilisées comme agents nutritifs et comme substituts alternatives aux ingrédients (Farine de soja, germe de blé et extrait de levure) sans affecter la production de la diète standard. La quantité des rejets agroindustriels a été ajoutée durant la production de la diète alternative tout en conservant la concentration de protéines ($3.71 \pm 0.09\text{g}$), de glucides ($4.2 \pm 0.12\text{g}$) et de lipides ($2 \pm 0.08\text{g}$) contenu dans la diète standard. Les variétés de diètes produites avec les différentes concentrations des rejets et des ingrédients sont testées par l'élevage de *Cydia pomonella* dans le but d'optimiser la diète en termes de nutriments et de viscosité optimales (pour facilité l'assimilation des nutriments). L'optimisation des paramètres d'élevage a été effectuée par la méthodologie des réponses en surface. Cette méthodologie a démontré que la diète (EMB+FS) à base des eaux usées de micro-brasseries (EMB) et la farine de soja (FS) a fourni les meilleurs résultats d'élevage de cet insecte (81 % d'éclosion, 76 % larves et 51 % d'adultes) proche de la diète contrôle (90 % d'éclosion, 80 % larves et 65 % d'adultes) et plus significatives que les autres diètes (40-70 % d'éclosion, 45-50 % larves et 9-30 % d'adultes). Ainsi, la viscosité était plus élevée pour les diètes qui avaient leur concentration en solides totaux (ST) qui était très élevée. L'augmentation de la viscosité était en accord avec la solidification de la gélose qui évolue rapidement avec le temps et en relation avec les ST des composants présents dans la diète.

Mots clés: Diète, méthodologie des réponses en surface, eaux usées, agroindustriel, *Cydia pomonella*.

ABSTRACT

In this study, apple pomace and brewery wastewater were used as nutritive agents and as alternatives substitutes to the ingredients (soya flour, wheat germ and yeast extract) without affecting the production of diet. The quantity of agro-industrial wastes added during the production was based on a regime where the different nutrients were maintained constant, such as proteins ($3.71 \pm 0.09\text{g}$), carbohydrates ($4.2 \pm 0.12\text{g}$) and lipids ($2 \pm 0.08\text{g}$) based on their concentration in the standard diet. Various diets produced using different concentrations of the wastes and the ingredients were tested using the culture of *Cydia pomonella* in order to optimize the diet in terms of nutrition and optimal viscosity (to facilitate assimilation of nutrients). Optimization of the rearing parameters was carried out using response surface methodology. The response surface methodology demonstrated that brewery wastewater (BWW-SF) diet provided the best results for insect rearing (81 % hatching, 76 % larvae and 51 % adults) which was closer to the control diet (90 % hatching, 80 % larvae and 65 % adults) and was more significant than the other diets (40-70 % hatching, 45-50 % larvae and 9-30 % adults). In addition, the viscosity was higher for the diets where the solids content was higher. The increase in viscosity was in agreement with the solidification of agar which evolved rapidly with time and in relation to the solids present in the diet.

Keywords: Diet, surface response methodology, wastewater, agroindustrial wastes, *Cydia pomonella*

1. Introduction

Studies on principal nutritional needs for the growth and reproduction of insects have been carried out since 1940 on various representative insects (Nation, 2001; Genc, 2002). The diets normally consist of synthetic nutritive and, semi-synthetic substances of vegetable or animal origin (Arijs and De Clercq; 2001; Cohen 2004; Genc, 2006). Among the nutritive substances, soya flour, wheat germ and yeast extract have been used as source of proteins, carbohydrates and lipids in the diet for the rearing of codling moth (Cohen 2004; Hansen and Anderson 2006; Toba and Howell 2006). These substances can be replaced by other compounds to reduce the cost of the diet while maintaining all the nutritive substances necessary for the growth of codling moth insects. The favorable growth of *Cydia pomonella* depends on the nutritional balance of different semi-synthetic (soya flour, wheat germ and yeast extract) and synthetic (sucrose, agar, methyl hydroxyl benzoate, rock salt, vitamins, ascorbic acid, water) substances as found the standard diet (Chapman, 1998; Nation, 2001). The replacement of these ingredients must maintain or improve their nutritive potential and their texture. The food imbalance is often responsible for the small size and stress in the insects (Genc, 2002) which is produced at three levels: variation of the total quantity of introduced food; variation of the diets with a different nutritive balance, and efficacy of nutritive substances. Thus, to produce an economical diet without affecting the quantity and texture of the diet, apple pomace wastewater and brewery wastewater, could be used to replace the nutritive characteristics (proteins, carbohydrates, lipids and minerals). In fact, rich nutritive potential of wastewater and agro-industrial sludge has been already exploited earlier for the production of various value added products (Cohen 2003; Brar et al., 2009; Khan et al, 2009; Nielsen et al, 2004; Tyagi et al, 2004; Gnepe et al., 2010; Tarek et al, 2010). This substrate can be used as an ideal substitute of the ingredients replaceable (soya flour, wheat germ and yeast extract). Nevertheless, these new nutritive agents must be used in methodical and concise manner. Hence, response surface methodology must be adopted for the reduction of the number of planned experiments and optimization of the results (Ha et al., 2009; Tarek et al., 2010) which will make it possible to produce improved diets (in nutrition and texture) to allow improved growth of *Cydia pomonella*. In order to improve texture of the produced diet, a study of agar which is made up of complex polysaccharides (Lahay, 2001; Lahrech et al., 2005), and is responsible as a gelling agent for solidification and viscosity of the diet remains a very significant element for the availability of nutrients and assimilation of diet. The objectives investigated as a part of this study are:

- 1) Production of a diet for the rearing of codling moth by using apple pomace and microbrewery wastewater;
- 2) Optimization of the culture of *Cydia pomonella* larvae by response surface methodology to determine the best diet in terms of nutrients (proteins, carbohydrates and lipid) and viscosity;
- 3) Study of the properties of agar mixed with diet as a function of time and temperature.

2. Material and methods

2.1. Codling moth larvae

The eggs of codling moth, *Cydia pomonella* (L) reared in INRS-ETE laboratory (University of Quebec) were provided by BioTepp Inc. (Cap-Chat, Québec, Canada). The larvae were reared on the alternative diet, in a sterile environmental chamber ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 0.5\%$ moisture and 16:8 h of photoperiod).

2.2. Culture media for rearing codling moth larvae

Diets used for the rearing of codling moth larvae included: (1) Control diet (standard diet of biotepp Inc), composed of semi-synthetic ingredients (6.85 g soya flour, 1.6 g yeast extract and 2.2 g wheat germ), synthetic substances (0.55 g Van der Zan vitamin, 0.99 g Wesson salt mixture, 1 g sucrose, 0.5 g ascorbic acid, 1.3 g methyl-p-hydroxy benzoate) and 50 ml sterile milli-Q water; (2) alternative diet, composed of brewery industry wastewater (BWW) from barberie (Quebec) and; (3) apple pomace pulp waste (POM) from Lassonde Inc., Rougemont (Quebec) lyophilized, as substitute of semi-synthetic ingredients.

The rearing of codling moth larvae was carried out on 3 different alternative diets produced using different waste quantities: The initial quantity (noted 1) necessary for replacement of ingredients on the basis of nutrients (proteins, carbohydrates and lipids); replacement as half (noted $\frac{1}{2}$); and replacement as one third (noted $\frac{1}{3}$) is elaborated in Table 1. Mass of wastes necessary to replace ingredients in the control diet was determined by Equation (1).

$$\frac{\text{Ingredient mass} \times \text{Nutrient concentration in ingredient}}{\text{Nutrient concentration in waste}} \quad (1)$$

During this study, several rearing parameters (Equations 2, 3, 4) were tested as in Table 3 for different diets comprising brewery (BWW: experiment 9; BWW+SF: experiment 13; BWW+YE: experiment 10; BWW+WG: experiment 11; BWW+SF+YE: experiment 14; BWW+SF+WG: experiment 15; BWW+YE+WG: experiment 12; BWW+SF+YE+WG: experiment 16), diet with apple pomace (POM: experiment 17; POM+SF: experiment 21; POM+YE: experiment 18; POM+WG: experiment 19; POM+YE+SF: experiment 22; POM+WG+SF: experiment 23; POM+YE+WG: experiment 20; POM+SF+YE+WG: experiment 24), diet with apple pomace and

brewery waste (BWW+POM: experiment 25; BWW+POM+SF: experiment 29; BWW+POM+YE: experiment 26; BWW+POM+WG: experiment 27; BWW+POM+YE+SF: experiment 30; BWW+POM+WG+SF: experiment 31; BWW+POM+YE+WG: experiment 28), standard diet of BioTepp (experiment 8) and experimental control diet (number 43 to 48).

$$\% \text{Hatching} = \frac{\text{Hatched eggs}}{\text{Total eggs}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{Larvae growth} = \frac{\text{Adult larvae}}{\text{Total eggs}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{Adult moth growth} = \frac{\text{Adult moth}}{\text{Total eggs}} \times 100 \quad (4)$$

The insects reared on these diets, possessed longer development time (1 month to 45 days), and a limited life (6 to 10 days) for adults.

2.3. Viscosity

Waste and standard diet viscosity (all ingredients were mixed in 40 ml of milliQ water without agar) were studied by using a rotational viscometer Brookfield DVII PRO (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MY, the USA) equipped with Rheocalc 32 software. The spindle SC-34 (small sample adaptor) was used with a sample cup volume of 18/50 mL.

Viscosity study allowed to determine the consistency of the diet produced using wastes, to estimate the quantity of nutrients required by larvae during rearing experiments.

The viscosity profile of each diet was analyzed according to time and temperature. During this production, 10g of agar was mixed in 1000 ml of milli-Q water and sterilized in autoclave at $121 \pm 1^\circ\text{C}/15 \text{ min}$.

2.4. Experimental plan for optimization of diets used for rearing of codling moth

The optimization experiments of diets produced using wastes of POM and EMB for the rearing of the codling moth larvae were carried out by using following five parameters: concentration of apple pomace wastewater (POM), brewery wastewater (BWW), soya flour (SF), wheat germ (WG) and yeast extract (YE). Each variable was studied at 4 levels in different combinations.

The response surface methodology was employed for the selection of experiments to determine the optimum values (Table 2).

Once the provisional optimal values were determined, a central composite design (CCD) was used to check the significance of the impact of each factor for the response. A central composite design, 2^5 was employed at five levels, leading to 48 experiments, including, 32 end points, 6 central points and 10 stars ($\alpha=2$). The level of each factor, with their codes and values are present in Table 3.

After the realization of the experiments of central composite design, a regression equation of second-order polynomial was adapted to the data (Equation 5).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

Y = experimental response; β_0 = average of experimental response; β_i = estimation of the main effect of the factor j for the response Y ; β_{ii} = estimation of the second effect of the factor i for the response Y ; β_{ij} = estimation of the effect of interaction between factors i and j for the response Y ; X_i and X_j = independent variables influencing the response of Y ; β_{ii} and β_{ij} = dependent variables for the predicted response.

2.5. Physico-chemical parameters

The concentration of proteins in the samples was determined by the multiplication of organic nitrogen present by 6.25. The organic nitrogen was obtained by calculating $[\text{NH}_4^+]$ and nitrogen present in the wastes and the diets were studied according to the standard methods (APHA, 2005). The measurement of total nitrogen in agro-industrial wastewater was performed using nitrogen analyzer (Leco CINS-932, US) according to the standard methods (MENQ, 1986; APHA, 2005).

Soluble carbohydrates of the wastes and the diets, essential elements for the source of energy, the mobility and formation of cuticle of the insects (Cohen, 2004) were analyzed using the anthrone method (Moris, 1948; Bachelier & Gavinelli, 1966).

The lipids were determined in 2g of sample, according to the gravimetric method followed by extraction by microwave oven (MARS RX, CEM Corporation, Matthews, NC, USA). This technique, more precise than the Soxhlet method (Salghi, 2008), makes it possible to analyze

using low volume (20 to 50 ml) of mixture of solvent of ethyl cyclohexane/acetic acid in lesser time (50 min to 1h) at 80°C (Eskilsson et Björklund, 2000; Batista et al, 2001).

2.6. Statistical analyses

The analysis of the data, regression coefficient and surface response methodology was carried out by analysis of variance (ANOVA) by employing the software, STATISTICA version 8 (Statsoft.com). The degree of confidence for this study was fixed to be 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of apple pomace and microbrewery used for the production of diets for rearing of *Cydia pomonella*

The analysis of brewery wastewater (BWW) is presented in Table 1. BWW was rich in proteins (1.69 % w/v), carbohydrates (2.5% w/v) and lipids (0.6%w/v) as compared to pomace (1.13 % w/v proteins, 2.2 % w/v carbohydrates and 0.2 % w/v lipids). The nutrient composition of BWW was related to the higher solids concentration (6.65 % w/v) and higher viscosity (770 mPa.s) when compared to pomace (4.5% w/v TS and 460 mPas viscosity).

For the production of diets tested for the rearing of codling moth, the wastes were used to replace the ingredients of the standard diet (soya flour, wheat germ and yeast extract) as a function of the nutrient concentration (proteins, lipids and carbohydrates) as presented in Table 2. As per these results, 13 ± 0.2 g of POM and 10 ± 0.15 g of BWW represent the nutrient concentrations closer to the standard diet (4.2 ± 0.12 g carbohydrates, 3.7 ± 0.09 g proteins and 2 ± 0.08 g lipid). In fact, according to Toba and Howell (2006), the quantity of ingredients must be in sufficient quantity to provide the maximum quantity of nutrients necessary for larval growth.

3.2. Experimental plan for response surface methodology (RSM)

CCD of 2^5 with 5 factors (POM, BWW, SF, WG and YE concentration) and 3 parameters of rearing (hatching rate, larval growth rate and adults) as responses permitted to evaluate the selected experiments. The results of 42 combinations and 6 replicates of diets are shown in Table 3. Column 1 of Table 3 represents the diets produced using various components at different concentrations. The experiment 8 represents the control diet using only conventional ingredients in standard quantity (7 g SF, 2.4 g WG and 2 g YE). The concentrations with negative values obtained after selection of the model from Table 3 were regarded as null during the production of the diet.

Various diets produced using the wastes as depicted in Table 3 showed that the diets corresponding to experiments (13 and 21) provided increased hatching of eggs (75% w/w and 64% w/w), larvae (66% w/w and 52% w/w) and adults (42 % w/w and 35 % w/w) compared to the standard diet (90 %w/w hatching, 81 %w/w larvae and 70% w/w adults). Effects of addition

of soya flour to BWW and POM was prominent as compared to the contribution by wheat germ and yeast extract taking into account the consistency of mass and concentration of nutrients brought about by these ingredients to the diets (Table 3 and 5). In order to perform the optimization of diets, larval growth was studied for surface response methodology, as it is an important parameter which allows consumption of diets during their growth.

3.3. Optimization of diets by response surface methodology (RSM)

The results of RSM experiments are presented in Table 4 which shows the actual and predicted values for development of larvae on the produced diets. The residual values are the difference between the actual and the predicted values. The growth of larvae increased by 9.6 % and 8.7 % for the diets BWW-SF and POM-SF compared to the control diet which was 27.4 %. Under these conditions, the growth of larvae on the diets comprising BWW-FS and POM-SF made it possible to increase the percentage of larval growth to 10%. These results were due to the rich nutrient content and viscosity of the diet closer to that of the standard diet (Table 5). This depends on the viscosity and the quantity of nutrients provided by SF and POM and BWW wastes in the diets.

The statistical significance of the polynomial model of second order was verified by ANOVA. This translated to the fact that the polynomial model of the second order comprising a coefficient of determination $R^2 = 0.80$ ensured an adjustment of the quadratic model of the experimental data.

Table 6 presents the effects of estimates of each variable and their interactions on the parameters of larval rearing with the regression coefficient of each component determined by regression analysis. The quadratic effect of variables of POM (Q) and BWW (Q) were highly significant ($p < 0.05$), followed by the quadratic effect of the concentrations of SF, WB and YE which were not statistically significant ($p > 0.05$). The linear effects of variables, EMB (L) and FS (L) were significant ($p < 0.05$) and the interaction between their effects were slightly significant ($p < 0.05$). On the other hand, the interaction between the effects, POM (1L) and EMB (2L) was highly significant ($p < 0.0001$). The interactions existing between other factors were not significant ($p > 0.05$) as presented in Table 6. The positive signs of the effects of variables indicated that the influence of variables on the growth of larvae were larger in the higher range (0.44 and 3.56). When the signs of the effects of the variables tested were negative, the influence of these variables on the growth of the larvae was larger in the lower range.

According to the data presented in Table 6 and as per the interactions which took place between BWW and POM, POM and soya flour (SF), BWW and SF, BWW and wheat germ (WG), the polynomial model of second order is presented by Equation 6.

$$Y = 0 + (4.04 \times \text{POM} + 6.67 \times \text{BWW} + 4.55 \times \text{SF}) + 0 + (-0.41 \times \text{BWW} \times \text{POM} - 0.17 \times \text{POM} \times \text{SF} - 0.25 \times \text{BWW} \times \text{SF} - 0.63 \times \text{BWW} \times \text{WG}) \quad (6)$$

$$\beta_0 = 0 \text{ et } \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 = 0 \text{ dans l'équation (6)}$$

3.4. Analysis of optimization of experimental plan by RSM

Figure 1 shows growth rate of the larvae on the diets which consisted of various components (BWW-POM, BWW-SF, POM-SF and BWW-WG) presenting a significant interaction ($p < 0.05$) as seen in Table 6. The results observed in these diets made it possible to demonstrate the effect of wastes (POM and BWW) and ingredients (WG, SF and YE) on the growth of larvae. The results demonstrated that each variable corresponded to the intensity of the response. Figure 2 showed BWW-POM as a source of nutrient in addition to other ingredients (3.5 g of SF, 1.2 g of WG and 1g of YE) provided better results with regard to the growth of larvae (60%). The results obtained with other diets were satisfactory (40% BWW+SF, 40% POM+FS and 50 % BWW+WG). This was justified by the interaction between POM and EMB effects were highly significant ($p < 0.00001$) and the effects between BWW+SF, POM+SF and BWW+SF which were highly significant ($p < 0.05$) for larval rearing (Table 6). These results were satisfactory, in the sense that apple industry and brewery wastewater possessed higher viscosity. The diet mixture was in perfect synergy (related to the interaction between nutrients and particle size) with certain ingredients (SF and WG) which contributed to optimal growth of larvae.

Within the context of these results, BWW wastes and SF presented significant effect in interaction with other factors, taking into account higher nutrition content and TS concentration which was more important than other factors. In fact, a good diet is a result of synergy of nutrition and rheology of these components which provided higher viscosity and adequate concentration of nutrients (proteins, lipids, carbohydrates and minerals) which was very significant for the growth of insects (Cohen 2003; Cohen 2004; Hansen and Anderson, 2006). On the other hand, larger quantity of the 3 nutrients led to poor growth of larvae due to higher viscosity ($\eta > 850$ mPa.s and $\eta < 130$ mPa.s) and nutrient content which made food digestibility

difficult (Table 3 and 5). This is in agreement with the results of Hansen and Anderson (2006) who reported that the quantity of nutrients about variable viscosity and support the assimilation of diet the insects. Likewise diet ingredients in small quantity led to poor rearing of larvae, due to lower viscosity of the diets obtained which was inappropriate for the hatching of eggs and larvae. The diets, even in the presence of agar was solidified slowly, due to significant presence of water which can lead to proliferation of pathogens and dilution of nutritive content of various diets. In fact, according to Cohen (2004), nutrient content is the most significant factor in the diet for a balanced insect diet.

The results observed in Table 3 showed that the diets BWW+SF (experiment 13) and POM+SF (experiment 21) provided excellent results during rearing of larvae, thus there was a significant complementarity between the wastes and soya flour (SF) for the growth of larvae. The optimized viscosity (1589 ± 34 mPa.s) was obtained with experiment 34 (POM+BWW+SF+WG+YE), so that the optimized culture of larvae (62 %) was for the experiment 13 (BWW+SF) which was closer to that of the standard diet (90%). This diet showed a viscosity of 823 ± 29 mPa.s, the best optimized nutritive content (5.6 ± 0.19 g carbohydrates, 5.1 ± 0.17 g proteins and 2.4 ± 0.09 g lipids) closer to that of the standard diet (4.2 ± 0.12 g carbohydrates, 3.7 ± 0.09 g proteins and 2 ± 0.08 g lipids). This is interesting in terms of realization and economy of the process, as these wastes are easy to handle and, can replace 2 ingredients (WG and YE) in the standard diet without affecting the larval growth. Likewise, the total substitution of 3 ingredients (SF, WG and YE) by 2 wastes (BWW and POM) made it possible to obtain diets/experiments (9 and 17) which provided higher percentage of larvae (56% for BWW and 43% for POM).

3.5. Agar solution properties

Agar is an important ingredient, although not a nutrient per se, which determines the viscosity of the diet, and consequently the assimilation of diet by larvae due to higher viscosity. The solidification profile of the diet is shown in Figure 2 as a function of viscosity. Higher was the quantity of diet solidified with cooling and time, higher was the viscosity. Figure 2 shows a rapid increase in the viscosity of diets (POM, BWW and control) as a function of time, in the presence of agar (Fig 2a) and without agar (Fig 2b). Figure 2 showed that the viscosity of the diets produced with agar was higher (1500 mPa.s) as compared to the diets without agar.

The diet based on BWW provided higher viscosity (2696-2735 mPa.s) compared to the diet containing POM (2186-2226 mPa.s) and the control diet which provided lower viscosity (1952-2024 mPa.s). Figure 2b showed that the viscosity of diets decreased according to time. Figure 2b showed that the viscosity of the diet based on BWW was higher (846-632 mPa.s decrease) than that of the diet containing POM (273-164 mPa.s decrease) and control (146-133 mPa.s decrease) diets.

Viscosity increased slightly as addition of agar which solidified rapidly with the components present in the diet and cooling of the diet. According to Lahrech et al. (2005), taking into account the polysaccharide composition, the viscosity of the agar followed Arrhenius law below a certain cooling temperature temperature (T_c) and increased in a vertical manner with higher T_c (38 °C) and then diverged as per the gelation temperature T_g ($T=28^\circ\text{C}$). At low temperature T_c , viscosity increased and diverged at the gelation temperature T_g ($T=28^\circ\text{C}$).

Thus, viscosity differed from one diet to another due to the quantity and total solids concentration of ingredients and wastes which influence the solidification of agar and increase the viscosity of diets. Figure 2 showed that viscosity of BWW diet was higher (500 mPa.s) than other diets due to TS concentration of BWW (64 g/L) which was higher than that of POM wastes (46 g/L) and also when compared to the ingredients of control diet (6.89 g of SF, 2.4 g of WG and 1.7g of YE). Thus, higher TS concentration used to produce diets led to higher viscosity, and vice-versa. Thus, these components can reduce the quantity of water present in the diet and support the weight increase, the solidification of agar with different diet components. This is explained by the fact that intrinsic viscosity $[\eta]$ of the diets at ambient temperature (28-40°C), evolved in correlation with the molecular size of agar and the components present in the diet in relation to the equation of Mark-Houwink $[\eta] = 0.07 M^{0.72}$, where M is the average molecular weight of the particles present in the diet (Rochas and Lahaye, 1989).

The viscosity behavior of diets was explained by the fact that in the absence of agar, the viscosity profile of the diets decreased as a whole, as the diet components settled progressively according to their molecular weight and size. This does not support the homogenization of diets which often presents several phases of settling and the nutrients are far from the surface and inaccessible to the larvae. This is unfavorable for the assimilation of diet by the larvae.

4. Conclusion

The present study showed that the centered composite plan and response surface methodology are effective methods for the determination of optimal conditions for the production of diet to improve the larval hatching rate of *Cydia pomonella*.

- a) Central composite design provided sufficient information for optimization to limit the number of individual experiments.
- b) During the production of diets, wastes (BWW and POM) replaced selected ingredients (soya flour, wheat germ and yeast extract) to maintain the quantity of nutrients (proteins, carbohydrates and lipids) present in the standard diet.
- c) Multiple test experiments carried out using response surface methodology demonstrated that BWW-SF diet provided higher larval results (75% hatching, 62% larvae, 42% adults) closer to that of the standard diet (90% hatching, 80 % larvae, 70 % adults) due to the quantity of nutrients present (5.6 g carbohydrates, 5.1 proteins and 2.4 lipids) and viscosity (823 mPa.s) of diet which supported assimilation of the diet by larvae.
- d) The viscosity was highly dependent on solidification of agar and mass composition of the diet. The diet solidified very rapidly from 40 to 30°C, between 30 sec to 1 min depending on the concentration of these components.

Acknowledgments

The authors are sincerely thankful to the natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, Canada Research chair), INRS-ETE and FQRNT (ENC) for financial support. We are grateful to BioTepp Inc. for providing us codling moth eggs for the research experiments. Thanks are also due to Barberie and Lassonde Inc. for providing us the wastes to perform the studies. The views and opinions expressed in this article are those of authors.

List of abbreviations

BWW	Brewery wastewater
BWW+SF	Yeast extract and wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+WG	Soya flour and yeast extract substituted by brewery wastewater
BWW+YE	Soya flour and wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+SF+YE	Wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+WG+YE	Soya flour substituted by brewery wastewater
BWW+SF+WG	Yeast extract substituted by brewery wastewater
BWW+POM	Wheat germ, soya flour and yeast extract substituted by brewery wastewater and apple pomace wastewater
CCD	Central composite design
Control	Control diet derived from Biotepp Inc
POM	Apple pomace wastewater
POM + SF	Yeast extract and wheat germ substituted by apple pomace wastewater
POM + WG	Soya flour and wheat germ substituted by apple pomace wastewater
POM + YE	Soya flour and yeast extract substituted by apple pomace wastewater
POM+SF+YE	Wheat germ substituted by apple pomace wastewater
POM+WG+YE	Soya flour substituted by apple pomace wastewater
POM+SF+WG	Yeast extract substituted by apple pomace wastewater
RSM	Response surface methodology
TS	Total solids
T _c	Cooling Temperature
T _g	Gelation temperature
% w/v	Weight per unit volume
% w/ w	Weight per unit weight
YE	Yeast extract

References

- APHA, AWWA & WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition.
- Arijs y & De-Clercq P (2004) Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *BioControl* 49: 505–516.
- Bachelier G & Gavinelli R (1966). Cahier ORSTOM, série Pédologie, vol. 4 (3).
- Batista A, Vetter W & Luckas B (2001) Use of focused open vessel microwave-assisted extraction as prelude for the determination of the fatty acid profile of fish R a comparison with results obtained after liquid-liquid extraction according to Bligh & Dyer. *European Food Research Technologies* 212: 377-384.
- Brar SK, Verma M, Valero JR, Tyagi RD & Surampalli RY (2009) Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2849–2857.
- Chapman RF (1998) The Insects: Structure and Function. 4th edition UK. *Cambridge University Press*: 770 pp.
- Cohen AC (2003). Insect diet science and technology. *CRC press. W. D.C*: 429 pp.
- Cohen AC (2004). Insect diet- Science and Technologi. *CRC Press, US* : 293 pp.
- Dadd RH (1985) Nutrition: organisms, in comprehensive insect physiology. *Biochemistry, and Pharmacology. Pergamon Press* 4: 313-390.
- Eskilsson CS & Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction *Journal of chromatography*. 902 (1): 227-50.
- Genc H (2002) *Phaon crescent, Phyciodes phaon :Life cycle, nutritional ecology and reproduction*. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA.
- Genc H (2006) General Principles of Insect Nutritional Ecology. *Trakya Univ J Sci*, 7(1): 53-57.
- Gnepe JR, Brar SK, Tyagi RD & Valéro JR (2011) Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides. *Journal of Environmental Science and Health Part 46*: 1–12.
- Hansen JD & Anderson PA (2006) Mass rearing codling moths: improvements and modifications. *Journal of Entomology Society of British Columbia* 103 (9): 33-36.
- Lahrecha, K.H., Safouanea, A., Peyrellasse, J. 2005. Sol state formation and melting of agar gels rheological study. *Physica A* 358, 205–211.
- Lahay MJ (2001) *Appl. Phycol.* 13 : 173.

- MENV (2004). Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes. Critères de référence et normes réglementaires. *Ministère de l'Environnement, Québec* : 127 p.
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107: 254-255.
- Nation JL (2001) *Insect Physiology and Biochemistry*. Boca Raton, Fla., CRC Press: 485 pp.
- Rochas C, Lahaye M (1989) *Carbohydr. Polym.* 10 :289.
- Salghi R (2008). Différentes Filières De Traitement Des Eaux. Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir-ENSA, 31.
- Tarek R, Rojan PJ, Brar SK, Tyagi RD & Prévost D (2010) Centrifugal recovery of rhizobial cells from fermented starch industry wastewater and development of stable formulation. *Industrial Biotechnology* Vol. 6 : N° 1.
- Toba H H, Howell J F (1991) An improved system for mass-rearing codling moths. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 88: 22-27.

Table 2.3.1: Screening of various wastes

Samples	Weight of residual wastes (g)		SF(g)	WG (g)	YE (g)	Carbohydrates (g)	Proteins(g)	Lipids(g)
Standard Diet	-	-	7±0.1	2.4±0.1	2±0.1	4.2 ± 0.12	3.71±0.1	2± 0.08
BWW (g)	1*	20± 0.3	-	-	-	6.4± 0.1	5.4± 0.1	1.9± 0.07
	1/2*	10± 0.2	-	-	-	3.2± 0.09	2.7± 0.1	0.95±0.06
	1/3*	5± 0.1	-	-	-	1.6± 0.05	1.4± 0.1	0.48±0.04
POM (g)	1*	26± 0.3	-	-	-	6.5± 0.11	4.2± 0.2	1.82±0.05
	1/2*	13± 0.3	-	-	-	3.25± 0.08	2.1± 0.1	0.91±0.02
	1/3*	7.5±0.2	-	-	-	1.88±0.07	1.2± 0.1	0.53±0.01

*: Quantity of waste added to the diet (1= initial; 1/2= half and 1/3= Third)

±: Standard Error; n = 5

SF: Soya flour

WG: Wheat germ

YE: Yeast extract

Table 2.3.2: Codes and values of independent variables of different levels of 25 for central composite design (CCD) using response surface methodology (RSM)

Factors	Symbol	Levels (g)				
		-2	-1	0	+1	+2
Pomace wastewater (g)	POM	-6.5	0	6.5	13	19.5
Brewery wastewater (g)	BWW	-5	0	5	10	15
Soya flour (g)	SF	-3.5	0	3.5	7	10.5
Wheat Germ (g)	WG	-1.2	0	1.2	2.4	3.6
Yeast extract (g)	YE	-1	0	1	2	3

Table 2.3.3: Study of rearing parameters for diets produced using RSM

Diets	POM	BWW	SF	WG	YE	% hatching	% larvae	% adults
1	0	0	0	0	0	13	8	0
2	0	0	0	0	2	18	10	0
3	0	0	0	2.4	0	23	15	1
4	0	0	0	2.4	2	33	20	5
5	0	0	7	0	0	28	25	10
6	0	0	7	0	2	36	28	13
7	0	0	7	2.4	0	45	34	15
8	0	0	7	2.4	2	90	90	62
9	0	10	0	0	0	66	56	14
10	0	10	0	0	2	68	60	16
11	0	10	0	2.4	0	71	63	20
12	0	10	0	2.4	2	76	65	27
13	0	10	7	0	0	79	76	32
14	0	10	7	0	2	83	69	37
15	0	10	7	2.4	0	88	65	45
16	0	10	7	2.4	2	75	55	28
17	13	0	0	0	0	52	43	19
18	13	0	0	0	2	55	46	25
19	13	0	0	2.4	0	58	53	28
20	13	0	0	2.4	2	60	58	32
21	13	0	7	0	0	68	66	25
22	13	0	7	0	2	60	58	19
23	13	0	7	2.4	0	70	55	21
24	13	0	7	2.4	2	73	49	26
25	13	10	0	0	0	51	48	22
26	13	10	0	0	2	55	35	19
27	13	10	0	2.4	0	53	37	20
28	13	10	0	2.4	2	52	33	21
29	13	10	7	0	0	58	40	24
30	13	10	7	0	2	59	35	26
31	13	10	7	2.4	0	62	31	25
32	13	10	7	2.4	2	64	29	23
33	-8.96	5	3.5	1.2	1	38	34	20
34	21.96	5	3.5	1.2	1	41	29	8
35	6.5	-6.89	3.5	1.2	1	40	35	22
36	6.5	16.89	3.5	1.2	1	39	30	9
37	6.5	5	-4.82	1.2	1	47	42	16
38	6.5	5	11.82	1.2	1	41	36	12
39	6.5	5	3.5	-1.65	1	50	45	18
40	6.5	5	3.5	4.05	1	49	44	13
41	6.5	5	3.5	1.2	-1.38	52	47	17
42	6.5	5	3.5	1.2	3.38	51	45	15
43C	6.5	5	3.5	1.2	1	58	52	22
44C	6.5	5	3.5	1.2	1	57	51	21
45C	6.5	5	3.5	1.2	1	58	52	20
46C	6.5	5	3.5	1.2	1	59	53	22
47C	6.5	5	3.5	1.2	1	58	53	22
48C	0	0	0	0	0	54.0	53.34	0.66

*The shaded sections correspond to the diets which provided best larval breeding ($p < 0.05$)

Table 2.3.4: Observed, predicted and residual values of larval rearing resulting from CCD experiments

Diets	Factors in code units					Observed values (%)	Predicted Values (%)	Residual values (%)
	POM	BWW	SF	WG	YE			
1	-1	-1	-1	-1	-1	8.0	4.67	3.33
2	1	-1	-1	-1	-1	10.0	11.14	-1.14
3	-1	1	-1	-1	-1	15.0	18.36	-3.36
4	1	1	-1	-1	-1	20.0	31.96	-11.96
5	-1	-1	1	-1	-1	25.0	29.08	-4.08
6	1	-1	1	-1	-1	28.0	36.43	-8.43
7	-1	1	1	-1	-1	34.0	38.15	-4.15
8	1	1	1	1	1	60.0	52.62	7.38
9	-1	-1	-1	1	-1	56.0	59.38	-3.38
10	1	-1	-1	1	-1	60.0	55.22	4.78
11	-1	1	-1	1	-1	63.0	57.94	5.06
12	1	1	-1	1	-1	65.0	60.91	4.09
13	1	1	1	1	1	60.0	52.62	7.38
14	1	-1	1	1	-1	69.0	63.13	5.87
15	-1	1	1	1	-1	65.0	60.35	4.65
16	1	1	1	1	-1	55.0	64.20	-9.20
17	-1	-1	-1	-1	1	43.0	48.52	-5.52
18	1	-1	-1	-1	1	46.0	45.62	0.38
19	-1	1	-1	-1	1	53.0	50.84	2.16
20	1	1	-1	-1	1	58.0	55.06	2.94
21	1	1	1	1	1	60.0	52.62	7.38
22	1	-1	1	-1	1	58.0	55.28	2.72
23	-1	1	1	-1	1	55.0	54.99	0.01
24	1	1	1	-1	1	49.0	60.09	-11.09
25	1	1	1	1	1	60.0	52.62	7.38
26	1	-1	-1	1	1	35.0	36.07	-1.07
27	-1	1	-1	1	1	37.0	36.79	0.21
28	1	1	-1	1	1	33.0	30.39	2.61
29	-1	-1	1	1	1	40.0	41.01	-1.01
30	1	-1	1	1	1	35.0	28.36	6.64
31	-1	1	1	1	1	31.0	23.58	7.42
32	1	1	1	1	1	29.0	18.05	10.95
33	-2	0	0	0	0	34.0	36.71	-2.71
34	2	0	0	0	0	29.0	33.98	-4.98
35	0	-2	0	0	0	35.0	28.82	6.19
36	0	2	0	0	0	30.0	43.87	-13.87
37	0	0	-2	0	0	42.0	35.66	6.34
38	0	0	2	0	0	36.0	50.02	-14.02
39	0	0	0	-2	0	45.0	46.33	-1.33
40	0	0	0	2	0	44.0	50.35	-6.35
41	0	0	0	0	-2	47.0	49.28	-2.28
42	0	0	0	0	2	45.0	50.41	-5.41
43C	0	0	0	0	0	52.0	53.34	-1.34
44C	0	0	0	0	0	51.0	53.34	-2.34
45C	0	0	0	0	0	52.0	53.34	-1.34
46C	0	0	0	0	0	53.0	53.34	-0.34
47C	0	0	0	0	0	53.0	53.34	-0.34
48C	0	0	0	0	0	54.0	53.34	0.66

*The shaded sections correspond to the diets which provided best larval breeding ($p < 0.05$)

Table 2.3.5: Design showing the sets of each run and corresponding nutrient and viscosity

Diets	Viscosity (mPa.s)	Carbohydrates (g)	Proteins (g)	Lipids (g)
1	0.9	0	0	0
2	29	0.7	0.7	0.1
3	32	1.1	0.7	0.3
4	33	1.8	1.32	0.33
5	34	2.4	2.4	1.4
6	38	3.1	3.1	1.5
7	47	3.5	3.1	1.7
8	142	4.2	3.71	2
9	770.5	3.2	2.7	1
10	803	8.9	3.4	1.1
11	806	4.3	3.4	1.2
12	814	5	4.2	1.3
13	823	5.6	5.1	2.4
14	825	6.3	5.7	2.5
15	838	6.7	5.8	2.6
16	857	7.4	6.4	3
17	460	3.25	2.08	0.91
18	468	3.95	2.78	1.01
19	483	4.35	2.78	1.21
20	489	5.05	3.48	1.31
21	492	5.65	4.48	2.31
22	496	6.35	5.18	2.41
23	499	6.75	5.18	2.61
24	427	7.45	5.79	2.91
25	987	6.45	4.78	1.91
26	1011	7.2	5.4	1.9
27	1018	7.6	5.4	2.1
28	1023	8.2	6.1	2.2
29	1026	8.8	7.2	3.3
30	1030	9.5	7.8	3.4
31	1039	9.9	7.8	3.5
32	1045	10.7	8.5	3.9
33	398	3.7	3.2	1.4
34	1589	9.5	6.9	3
35	409	3.96	3.1	1.41
36	1279	9.4	7.7	2.1
37	599	4.4	0	1.2
38	858	9.3	7.94	3.79
39	612	5.01	4.1	1.8
40	645	9.05	6.73	2.98
41	618	5.2	4.1	1.8
42	627	8.12	6.15	2.84
43C	624	5.6	4.4	1.9
44C	624	5.6	4.4	1.9
45C	624	5.6	4.4	1.9
46C	624	5.6	4.4	1.9
47C	624	5.6	4.4	1.9
48C	624	5.6	4.4	1.9

*The shaded sections correspond to the diets which provided best larval breeding ($p < 0.05$)

Table 2.3.6: Effect of estimation and regression coefficient of the components of model fitted to the data of CCD; R² = 0.804

Component	Estimation effect		Regression Coefficient	
	Effect	p	Coefficient	p
Constant	53.34	0.0	4.67	0.47
(1)POM (L)	-1.1494	0.691270	4.4	0.000001
POM (Q)	-6.3633	0.022616	-0.08	0.022616
(2)BWW(L)	6.3309	0.035686	6.67	0.000000
BWW(Q)	-6.0097	0.030467	-0.12	0.030467
(3)S (L)	6.0364	0.044435	4.55	0.001425
SF (Q)	-3.7116	0.169806	-0.15	0.169806
(4)WG(L)	1.6910	0.559715	7.18	0.065162
WG (Q)	-1.7671	0.507586	-0.62	0.51
(5)Y (L)	0.4730	0.870028	4.47	0.33
YE (Q)	-1.2367	0.642134	-0.62	0.64
1L by 2L	-26.8125	0.000000	-0.41	0.000000
1L by 3L	-7.8125	0.026615	-0.17	0.027
1L by 4L	-5.6875	0.099236	-0.364	0.099236
1L by 5L	-4.6875	0.170793	-0.361	0.170793
2L by 3L	-8.6875	0.014662	-0.25	0.014662
2L by 4L	-7.5625	0.031391	-0.63	0.031391
2L by 5L	-5.3125	0.122406	-0.53	0.122406
3L by 4L	-2.3125	0.493493	-0.28	0.493493
3L by 5L	0.4375	0.896485	0.063	0.896485
4L by 5L	3.5625	0.294344	1.484	0.294

*The shaded sections correspond to independent variables which provided very significant effect during larval breeding ($p < 0.05$)

Figure captions

Figure 2.3.1: Response surface graph of larval breeding percentage for BWW-WG diet (a); BWW-SF diet (b); POM-SF diet (c); and BWW-POM diet.

Fitted surface; Variable: % Larvae; 5 factors, 1 Blocks, 48 Runs; MS Pure Error = 1.1.

Figure 2.3.2: Viscosity profile of the diets produced: (a) with agar; and (b) without agar, as a function of time.

±: Standard Error; n = 5.

Figure 2.3.1

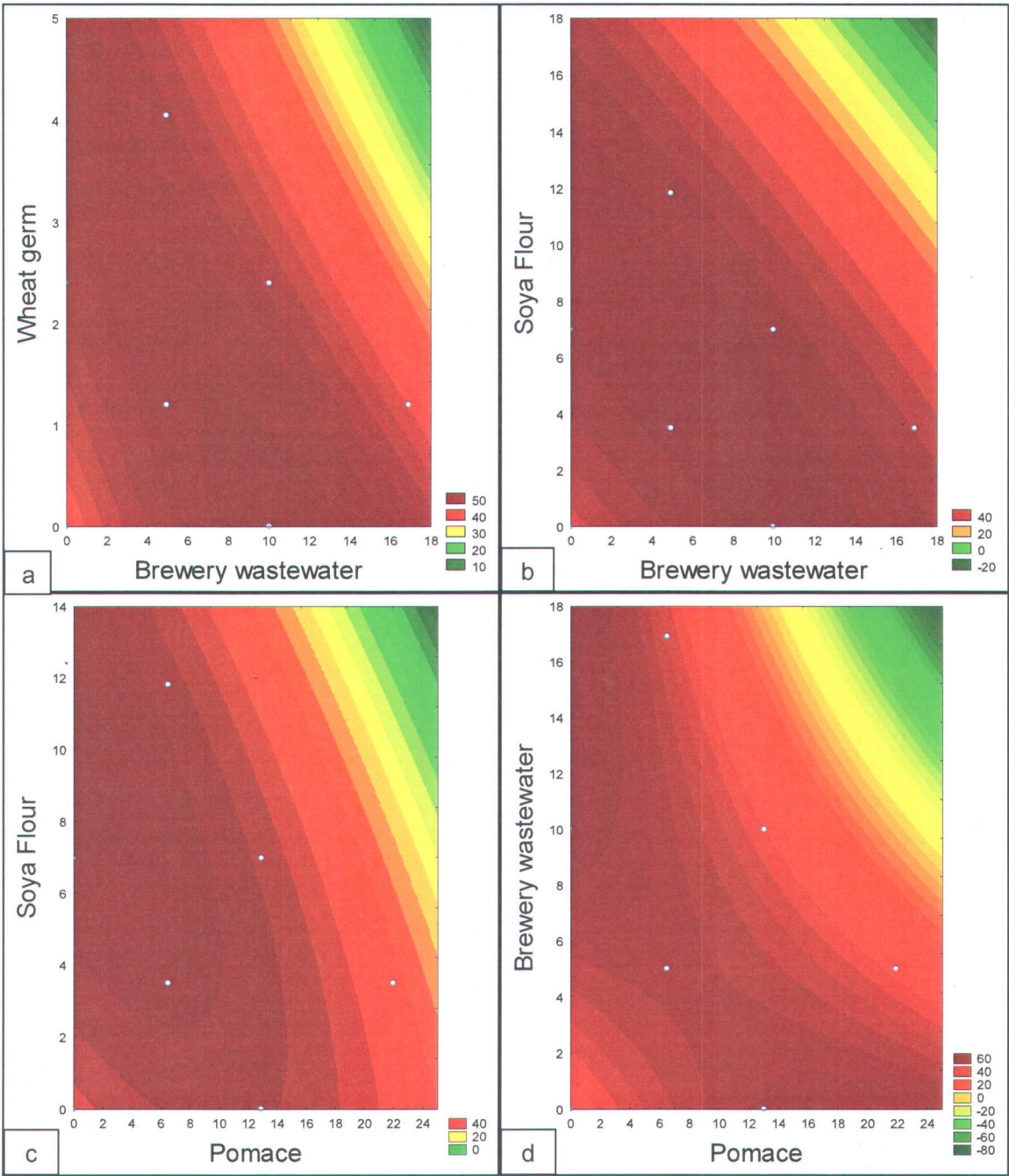
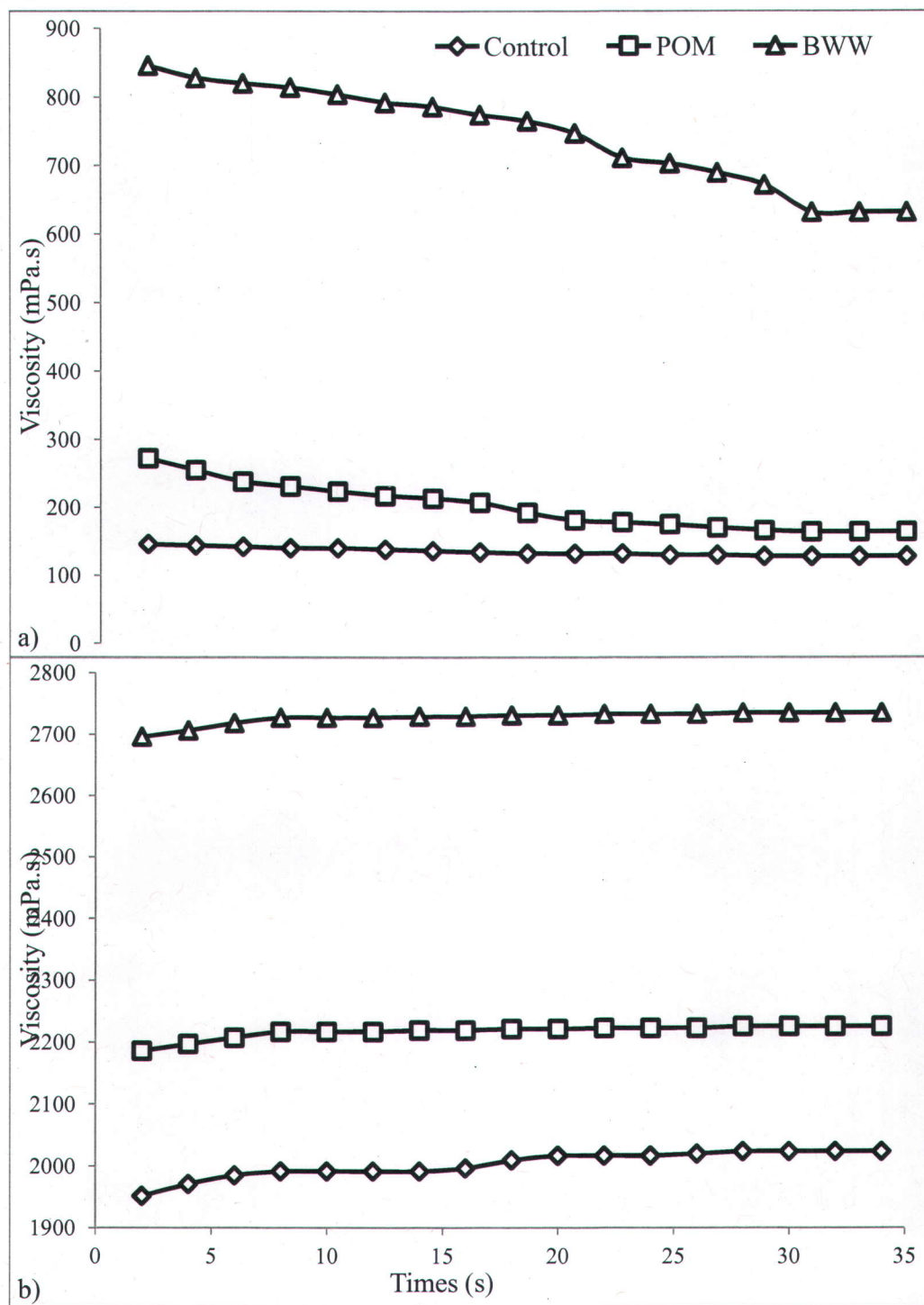


Figure 2.3.2



CHAPITRE III :

**Influence du prétraitement sur la croissance de
Cydia pomonella cultivé sur les diètes à base des
eaux usées**

CHAPITRE III - PARTIE 1

PRE-TREATMENT OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE USED AS ALTERNATIVE NUTRIENTS FOR REARING *CYDIA* *POMONELLA*

*Prétraitement des rejets agroindustriels utilisés comme agents
nutritifs alternatifs pour l'élevage de *Cydia pomonella**

Jean R. Gnepe¹, Satinder K. Brar, Rajeshwar D. Tyagi^{1*}, José R. Valero¹

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

Biosystems Engineering (2012), doi:10.1016/j.biosystemseng.2011.12.002

RÉSUMÉ

Les caractéristiques physico-chimiques et le potentiel nutritif des eaux usées d'industrie d'amidon (EUA), des eaux usées de micro-brasseries (EMB), des boues d'industrie de jus de pomme (POM) et les boues d'épuration municipales (BM) ont été comparés. Les résultats ont montré une concentration élevée en nutriments pour les rejets d'EMB ($19,52 \pm 2,1$ g l⁻¹ [protéines], $9,17 \pm 1,5$ g l⁻¹ [glucides] et $0,25 \pm 0,1$ g l⁻¹ [lipides]) et de POM ($16,1 \pm 1,3$ g l⁻¹ [protéines], $8,2 \pm 1,3$ g l⁻¹ [glucides] et $0,15 \pm 0,2$ g l⁻¹ [lipides]), et une faible concentration d'éléments toxiques (métaux) pour EMB ($0,005 \pm 0,0004$ mg Kg⁻¹ [Cd], $0,003 \pm 0,0002$ mg Kg⁻¹ [Pb], $0,021 \pm 0,003$ mg Kg⁻¹ [Al] and $1,66 \pm 0,2$ mg Kg⁻¹ [Fe]) et POM ($0,002 \pm 0,0002$ mg Kg⁻¹ [Cd], $0,0014 \pm 0,0001$ mg Kg⁻¹ [Pb], $0,019 \pm 0,002$ mg Kg⁻¹ [Al] et $1,61 \pm 0,2$ mg Kg⁻¹ [Fe]) comparativement aux EUA ($5,1 \pm 0,5$ g l⁻¹ [protéine], $7,5 \pm 0,8$ g l⁻¹ [glucides], $0,13 \pm 0,01$ g l⁻¹ [lipides], $0,003 \pm 0,0003$ mg Kg⁻¹ [Cd], $0,0025 \pm 0,0002$ mg Kg⁻¹ [Pb], $0,021 \pm 0,003$ mg Kg⁻¹ [Al] et $1,66 \pm 0,2$ mg Kg⁻¹ [Fe]) et BM ($7,8 \pm 0,9$ g l⁻¹ [protéine], $6,7 \pm 0,7$ g l⁻¹ [glucides], $0,12 \pm 0,01$ [lipides] et $5,6 \pm 0,6$ mg Kg⁻¹ [Cd], $138,6 \pm 13,9$ mg Kg⁻¹ [Pb], 1758 ± 176 mg Kg⁻¹ [Al] et 10782 ± 1080 mg Kg⁻¹ [Fe]).

Pour augmenter le potentiel nutritionnel et améliorer les caractéristiques rhéologiques des rejets, un procédé de prétraitement a été appliqué. L'hydrolyse des rejets d'EMB et de POM a été effectuée à pH initial, neutre et alcalin-10, à différentes températures (80 °C, 100 °C et 121 °C) et à divers temps (15, 30, et 45 min). Le traitement d'hydrolyse à 100 °C pendant 30 min est le meilleur procédé qui a fourni un excellent élevage des larves sur les diètes à base des rejets d'EMB et de POM traités.

Mots clés: Rejets agroindustrielle, eaux usées, boues, *Cydia pomonella*; hydrolyse, diète.

ABSTRACT

The physico-chemical and nutritional potential of starch industry wastewater (SIW), brewery wastewater (BWW) and apple pomace sludge (POM) and municipal wastewater sludge (WWS) were compared. The results showed higher nutrient content for BWW ($19.52 \pm 2.1 \text{ g l}^{-1}$ [proteins], $9.17 \pm 1.5 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrates] and $0.25 \pm 0.1 \text{ g l}^{-1}$ [lipids]) and POM ($16.1 \pm 1.3 \text{ g l}^{-1}$ [proteins], $8.2 \pm 1.3 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrates] and $0.15 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$ [lipids]), and lower concentration of toxic elements (metals) for BWW ($0.005 \pm 0.0004 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Cd], $0.003 \pm 0.0002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $0.021 \pm 0.003 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $1.66 \pm 0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]) and POM ($0.002 \pm 0.0002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Cd], $0.0014 \pm 0.0001 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $0.019 \pm 0.002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $1.61 \pm 0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]) as compared to SIW ($5.1 \pm 0.5 \text{ g l}^{-1}$ [protein], $7.5 \pm 0.8 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrate], $0.13 \pm 0.01 \text{ g l}^{-1}$ [lipid], $0.003 \pm 0.0003 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Cd], $0.0025 \pm 0.0002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $0.021 \pm 0.003 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $1.66 \pm 0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]) and WWS ($7.8 \pm 0.9 \text{ g l}^{-1}$ [protein], $6.7 \pm 0.7 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrate], 0.12 ± 0.01 [lipid] and $5.6 \pm 0.6 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Cd], $138.6 \pm 13.9 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $1758 \pm 176 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $10782 \pm 1080 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]). To increase the nutritional potential and improve the rheological characteristics pre-treatment was carried out. Hydrolysis of BWW and POM was performed at pH (initial, neutral and alkaline-10), at different temperatures (80°C , 100°C and 121°C) and time periods (15, 30, and 45 min). Hydrolysis at 100°C for 30 min proved effective for breeding of larvae for BWW and POM wastes.

Keywords: Agro-industrial wastes, wastewater sludge, *Cydia pomonella*, hydrolysis, diet.

ABBREVIATIONS

AIW	Agro-industrial waste
BWW	Brewery wastewater
BWW+SF	Yeast extract and wheat germ substituted by brewery wastewater
BWW+POM	Wheat germ, soya flour and yeast extract substituted by brewery wastewater and apple pomace sludge
Control	Control diet
POM	Apple pomace sludge
POM + SF	Yeast extract and wheat germ substituted by apple pomace sludge
POM + WG	Soya flour and wheat germ substituted by apple pomace sludge
POM + YE	Soya flour and yeast extract substituted by apple pomace sludge
POM+SF+YE	Wheat germ substituted by apple pomace sludge
POM+WG+YE	Soya flour substituted by apple pomace sludge
POM+SF+WG	Yeast extract substituted by apple pomace sludge
TS	Total solids
TS _{Non hydrolysed}	Total solids (non hydrolysed waste)
TS _{Hydrolysed}	Total solids (hydrolysed waste)
SF	Soya flour
SS	Suspended solids
VFA	volatile fatty acids
% w/v	Weight per unit volume
% w/w	Weight per unit weight
WG	Wheat germ
WWS	Wastewater sludge
YE	Yeast extract

Symbols

C_t	Total Carbon concentration
N_t	Total nitrogen concentration
NH_4^+	Ammonium concentration
$N-NH_3$	Ammoniacal nitrogen form
N_{org}	Organic nitrogen concentration

1. Introduction

The conversion wastewater sludge from municipalities and agro-industries into compost and value-added products (VAP) is simple and economic (Pham et al., 2010). These methods are more advantageous than disposal (i.e. landfill and incineration) methods, due to their positive impacts on environment and economy (Adjalle et al., 2007; Vu et al., 2009). Furthermore, agro industrial wastes such as starch industry wastewater-(SIW), brewery wastewater-(BWW) and apple pomace sludge- (POM)) are simple to treat and transform into VAPs because of their lower concentration of toxic elements and high nutrient concentration compared to municipal sludge (MS) (Brar et al., 2007; Perron and Hebert, 2007; Vu et al., 2009). However, the lower bioavailability of nutrients is a limiting factor for the reuse of these wastes when used as alternative materials for bioconversion. In fact, waste nutrients are insoluble and trapped in a complex form in the suspended material (aggregates of organic matter, extracellular polymer, cells or cellular fragment) or adsorbed on their surface. Furthermore, hydrolysis has been used for biodegradation of organic and inorganic matter to allow solubilisation of partial nutrients and mineral waste for its use for various bio-products. The solubilisation also reduces the viscosity and particle size of the waste which increases nutrient bioavailability which is useful for the production of diets used for breeding of codling moth (CM), *Cydia pomonella*.

Waste pre-treatment by thermal and alkaline hydrolysis has been reported to increase biodegradability of organic matter (Chu et al., 2002; Vlyssides and Karlis, 2004). According to Miron et al. (2000) and Scheider et al. (2000), hydrolysis allows the conversion of less biodegradable molecules (polysaccharides, triglycerides, proteins or polyamines) by reaction with water to lower molecular weight compounds. Thermal hydrolysis leads to the mineralisation of organic elements into CO₂, H₂O and inorganic elements by reactions of oxidation and gasification (Shanableh and Jomaa, 2001).

The first objective of this study was to characterise and select the waste having best nutrient potential (proteins, carbohydrates, lipids and minerals) and physical properties (viscosity and particle size). The second objective was to improve treatment (hydrolysis) to increase nutrient bioavailability.

2. Materials and methods

2.1 Codling moth

The eggs of CM, *Cydia pomonella* (L) reared in INRS-ETE laboratory (University of Quebec) were provided by BioTepp Inc. (Cap-Chat, Québec, Canada). The larvae and adults were reared on the alternative diet, in a sterile environmental chamber (Brar et al., 2008; Gnepe et al., 2011).

2.2 Sampling details

Starch industry wastewater (SIW) was obtained from ADM, Ogilvie (Montreal, Canada); brewery industry wastewater (BWW) (considered as sludge with TS > 50 g l⁻¹) was procured from Barberie (Quebec), apple pomace sludge (POM) was obtained from Lassonde Inc., Rougemont (Quebec) and municipal wastewater sludge (WWS) was procured from Quebec City.

2.3 Pretreatment (hydrolysis and freeze-drying)

The hydrolysis was carried out for low volumes (60-80 ml) of agro industrial wastes (BWW and POM), which are considered as rich in nutrients and eventually less toxic for CM breeding. The hydrolysis was performed in a microwave digester (Perkin Elmer and Paar Physica-Inc Shelton CT USA) at various temperatures (80, 100 and 121 °C), time intervals (15, 30 and 45 min) and different pH (initial, neutral and alkaline). The methods used have been already described by Barnabé et al. (2009) and Pham et al. (2010). During the entire study, the pH was adjusted using 1 mol l⁻¹ [NaOH]. Likewise, the wastes were subjected to freeze drying.

Freeze-drying allows maximum conservation of nutrients without affecting their initial state while facilitating their transport and stability over a long period (1-2 years) (Roux, 1994; Dumais, 1999). Despite the use of high energy, this pre-treatment preserves the nutrients as lipids and does not denature proteins, carbohydrates and vitamins which may be affected at 121 ± 1°C, during sterilisation.

2.4 Physical-chemical parameters

Total solids (TS), suspended solids (SS) and proteins (P) of agro-industrial and municipal wastes were determined according to standard methods (APHA et al., 2005).

The biodegradability of BWW and POM in this study was defined as percent concentration change of TS values after pre-treatment at time intervals (15, 30 and 45 min) and temperature (80, 100, 121 °C). Biodegradability was assessed by the decrease in TS after hydrolysis pre-treatment (Eq. 1).

$$\text{Biodegradability} = \left(\frac{\text{TS}_{\text{Non.Hydrolyzed}} - \text{TS}_{\text{Hydrolyzed}}}{\text{TS}_{\text{Non.Hydrolyzed}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Soluble carbohydrates (C) of the wastes and diets were analysed using the anthrone method (Moris, 1948; Bachelier and Gavinelli, 1966). Lipids (L) were determined through microwave extraction (Gnepe et al., 2011). Minerals were determined by APHA et al. (2005) and the Ministry of Environment of Quebec (MENV, 2004). Viscosity was measured using rotational viscometer as per the method described by Gnepe et al., 2011.

2.5 Experimental plan of the pretreatment optimization

For optimisation of the hydrolysis treatment, TS and SS, physical properties (viscosity and particles size) and nutrients (C_t , N_t , N_{org} , NH_4^+ , proteins, lipids, carbohydrates and mineral) concentration were estimated according to study plan presented in Table 1. During the treatment of BWW and POM waste, certain experimental parameters (temperature, time and pH) were varied while other parameters remained constant (TS and SS concentration). Table 1 indicates the experimental conditions and the code attributes for the experiment. The study comprised controls (in duplicates) and two types of wastes (BWW and POM) giving to a total of 54 experiments.

2.6 Culture media for rearing codling moth larvae

Diets used for rearing of codling moth larvae included: (1) control diet (standard diet of Biotepp Inc, Cap-Chat, Québec, Canada), (2) alternative diet, composed of hydrolysed waste (BWWH and POMH) or non-hydrolysed waste (BWW and POM) which was lyophilised, as substitute for semi-synthetic ingredients. The mass of wastes necessary to replace ingredients in the control diet was determined as per the protocol already established by Gnepe et al. (2011).

2.7 Statistical analyses

The analysis of data, regression coefficient and surface response methodology was carried out by analysis of variance (ANOVA) by employing the software, STATISTICA version 8 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, US). The degree of confidence for this study was fixed at $p = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Selection and characterization of agro-industrial wastes and municipal wastewater sludge (wws)

Among the agro-industrial wastes (AIW) screened (SIW, POM, BWS and WWS), POM and BWW were found to produce positive results for nutrient composition (Table 2). Hence, the use of AIW as nutrient substrate for diet production can provide excellent substrate for breeding of CM larvae. The analysis of wastes in Table 2 demonstrated higher nutrient concentration for BWW ($19.5 \pm 2 \text{ g l}^{-1}$ [proteins], $9.2 \pm 5.5 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrates], $0.25 \pm 0.1 \text{ g l}^{-1}$ [lipids]) and POM ($16.1 \pm 1.3 \text{ g l}^{-1}$ [proteins], $8.2 \pm 1.3 \text{ g l}^{-1}$ [carbohydrates] and $0.15 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$ [lipids]), and it was lower in toxic elements (metals) for BWW ($0.005 \pm 0.0004 \text{ mg/Kg}$ [Cd], $0.003 \pm 0.0002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $0.021 \pm 0.003 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $1.66 \pm 0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]) and POM ($0.002 \pm 0.0002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Cd], $0.0014 \pm 0.0001 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Pb], $0.019 \pm 0.002 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Al] and $1.61 \pm 0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$ [Fe]). The BWW comprised vegetable matter (malt, hop and fruits) and yeast. The wastes from POM was made up of crushed apples without pectin and are rich in sugars and flavours that give a natural niche feeling for the larvae. The BWW and POM wastes, rich in nutrients and lower in toxic elements compared to the SIW and WWS provided higher rates of CM breeding.

3.2 Hydrolysis influence on agro-industrial wastes biodegradability

Table 2 and Table 3 show total solids (TS) reduction of $66.5 \pm 7 \text{ g l}^{-1}$ to $59 \pm 6 \text{ g l}^{-1}$ for BWW and TS reduction of $45 \pm 5 \text{ g l}^{-1}$ to $33 \pm 3 \text{ g l}^{-1}$ for POM after hydrolysis treatment (30 min at 100°C). This pre-treatment provided lower biodegradation of solids matter (10.61 % for BWW and 27 % for POM).

The results demonstrated the fact that waste organic material simplified when the hydrolysis time increased (15 to 45 min), especially when hydrolysis temperature was higher (80 to 121°C). This can be explained by the fact that waste particles and cells are broken during longer duration of hydrolysis and under heat influence, pressure accelerated the particle and cell rupture to other soluble and volatile compounds (volatile fatty acids, acetate or propionate) (Barnabé et al., 2009; Pham et al., 2010).

Waste alkaline treatment (pH 10) contributed to elimination of more than 60 % (w/v) initial (control) waste solids of BWW (reduction of TS of $66.5 \pm 7 \text{ g l}^{-1}$ to $26 \pm 3 \text{ g l}^{-1}$) and POM (reduction

of TS of $45 \pm 5 \text{ g l}^{-1}$ to $8 \pm 0.8 \text{ g l}^{-1}$) after hydrolysis treatment. Coupled with hydrolysis treatment, the alkaline treatment improved the reduction in viscosity and particle size in waste and diet, but provided poor larval breeding due to higher concentration of sodium ions present in diet because only a trace quantity of sodium is required for larvae growth (Osborn and Mendel 1932; Nation 2001). The control used in this study comprised wastes without hydrolysis treatment. The waste organic material increased when hydrolysis time increased (15 to 45 min) and especially when hydrolysis temperature was higher (80 to 121 °C). It is explained by the fact that waste particles and cells were suitably broken during a longer treatment of hydrolysis and under heat influence, pressure accelerated the particle and cell rupture to other soluble and volatile compounds (volatile fatty acids, acetate or propionate) (Barnabé et al., 2009; Pham et al., 2010).

During hydrolysis, at high pH (>10) wastes bring about the extracellular polymer (ECP) desorption due to the increased negative charge on the surface of the organic particles (Shanableh and Jomaa, 2001) and the waste particles and the cells were broken suitably. Furthermore, hydrolysis by reaction with water resulted in to lower molecular weight compounds (volatile fatty acids, acetate or propionate) and molecules of high molecular weight (tryglycérider) which degrade with difficulty. Organic matter removal by hydrolysis is more effective for POM wastes than BWW wastes due to its homogeneous composition (a pasty structure stemming from the peel and crushed and filtered pulp which quickly gets degraded as compared to BWW waste which is more heterogeneous (malt, hop, rice, maize and fruit) in nature.

Table 3 presents the results of alkaline hydrolysis carried out at 100 °C, for 30 min, showing the changes in TS, SS, viscosity and particle size. The results were greatly improved with BWW waste (21 g l^{-1} [TS], 14 g l^{-1} of [SS] and 138 mPa.s viscosity). Furthermore, when these hydrolysis conditions were judged with regard to thermo-alkaline conditions (121 °C, 45 min and pH 10), the results were better. However, due to the consumption of more energy and chemicals (NaOH) during this process, it was not considered suitable for further investigation. Thus, thermo-alkaline hydrolysis (100 °C, 30 min and pH 10) was observed and chosen from Table 3, with the best results occurring where lower viscosity and lower particle size of BWW and POM was observed. Under these conditions, viscosity was lower for POM waste due to the effects of NaOH, hydrolysis time and temperature. Nevertheless, the BWW particle size was finer ($2.6 \mu\text{m}$). The reduction in viscosity and particle size during hydrolysis improved the rheology of the diet to product excellent larval breeding. These pre-treated alternative nutrient substrates enhanced nutrient bioavailability in diet and enhanced diet assimilation by CM larva.

3.3 Hydrolysis influence on nutrient potential of agro-industrial wastes

Table 4 presents nutrient potential (25 % total carbon concentration- C_t ; 15% total nitrogen concentration- N_t ; 10% NH_4^+ ; 12 % proteins, 10% carbohydrate and 8% lipids) of BWW and POM waste during hydrolysis treatment. The results showed that the nutrient potential improved when the hydrolysis time increased from 15 to 45 min and temperature increased from 80 to 121 °C. Thus, the lysis of waste particles and flocs during hydrolysis was accelerated by pressure under the influence of high temperature (Barnabé, 2004).

Alkaline treatment of wastes contributed to reduction in the nutrient potential in the same manner as organic matter (60%) for wastewater and sludge. The removal was more important for POM waste than BWW waste. Coupled with hydrolysis treatment, the removal was improved by 25% for the two wastes. NH_4^+ concentrations were higher for POM wastes due to enhanced biodegradability.

Waste concentration decreased due to the fact that carbon volatilised to CO_2 or volatile fatty acids (VFA) during thermal hydrolysis (100 °C and 120°C) and alkaline hydrolysis (pH 10). N_t decrease indicated a volatilisation of nitrogen as ammoniacal nitrogen ($N-NH_3$).

The results showed that alkaline pre-treated wastes provided best results for C_t , N_t , NH_4^+ , protein, carbohydrates and lipids. Under these conditions, the results were improved for BWW waste (30.5 g l⁻¹ [C_t]; 3.5 g l⁻¹ [N_t]; 0.449 g l⁻¹ [NH_4^+]; 19.07 g l⁻¹ [protein]; 11.33 g l⁻¹ [carbohydrate] and 0.127 g l⁻¹ [lipids]) as compared to POM waste (28.69 g l⁻¹ [C_t]; 2.8 g l⁻¹ [N_t]; 0.864 g l⁻¹ [NH_4^+]; 12.1 g l⁻¹ [protein]; 9.41 g l⁻¹ [carbohydrate] and 0.115 g l⁻¹ [lipids]). Further, the hydrolysis conditions were favourable for thermal-alkaline conditions (121, 45 min and pH 10) even if the observed results were higher due to the consumption of greater energy and chemicals (i.e. NaOH) during hydrolysis process.

At a hydrolysis temperature of 100 °C, the quantity nutrient increased by more 100% for proteins, more than 50% for lipids and 60% for carbohydrates following hydrolysis. However, hydrolysis carried out at high temperature (121 °C) led to mineralisation of organic compounds to CO_2 , H_2O and inorganic elements (mineral nitrogen and soluble minerals) (Schieder et al., 2000; Shanableh and Jomaa, 2001). Thus protein or polyamines were transformed into peptides, amines, amino acids, ammoniac, nitrite and nitrate (Penaud et al., 1999; Miron et al., 2000; Aravinthan et al., 2001). This phenomenon gradually denatured and reduced the waste

nutritive potential (C_t , N_t , N_{org} , protein, and lipid) after hydrolysis treatment at 121 °C, 45 min, at pH 10. Nevertheless, it did not affect the waste carbohydrates which resisted the heat exposure. The inorganic elements (metals and $N-NH_4^+$) and carbohydrates which were soluble continued to increase in solution after thermo-alkaline treatment. Analysis of hydrolysis conditions showed that the waste hydrolysis at 100 °C for 45 min was the best conditions.

3.4 Influence on soluble metals concentration

The results observed in Table 5, demonstrate trace elements and Fe (Table 2) except As, Co, Cr, Mo, Si, Al and restricted contaminants (Cd and Pb) which are not detectable, as they are present in trace. The study concerned the analysis of solubilisation of these metals after hydrolysis, as these micronutrients are indispensable for the growth of plants and animals (in this case *Cydia pomonella*).

The concentration of soluble metals in BWV and POM was lower, with respect to the municipal sludge where there was an increase in soluble phase after hydrolysis treatment. Hence, the concentration increased by more than 50 % in the soluble part obtained after centrifugation at 9000 g. In contrast to the soluble part, the concentration of metals decreased to 20 % in solid part with respect to the hydrolysed waste similar to the solid part of hydrolysed wastes.

Therefore, solubilisation of metals increased with hydrolysis of the organic matter which was carried out at 100 °C, for 30 min, due to the lyses of wastes and cells (Barnabé, 2004). Furthermore, at high temperatures (100-121°C), hydrolysis would lead to mineralisation of organic and inorganic material (Shanableh and Jomaa, 2001) which favours the solubilisation of metals due to discharge of metals from the solid part into the liquid part.

Table 5 shows the fact that POM supplied higher concentration of metals as compared to BWV. Metals concentration was higher in the non hydrolysed waste solid compared to the hydrolysed waste solid where it was lower (a decrease of 10 %).

In contrast, metals concentration was higher in the hydrolysed waste liquid phase compared to the non hydrolysed waste liquid phase. Hence, hydrolysis allowed an increase in the concentration of metals in the waste soluble phase by physical-chemical degradation. This high proportion of metals in the soluble phase can contribute to increase in the mineral concentration of the diet used for breeding of CM larvae. Metal concentrations in total or in the soluble liquid

phase were higher (more than double) for POM waste compared to BWW waste both before and after hydrolysis (Table 5).

These results were higher for the hydrolysed POM solid part (as seen in Table 5) and lower in the non-hydrolysed liquid part of BWW-100-30 (as seen in Table 5). Therefore, it could be concluded that POM waste was homogeneous, easily solubilised in solution and was richer in nutrients as compared to BWW which was more heterogeneous.

Although present in small concentration in the alternative diets through the added wastes, micronutrients are indispensable for certain functions (nutrition, locomotion and reproduction) to insects as they are cofactors of enzymes (Cohen, 2004; Genc and Nation, 2004). Thus, the contribution of the hydrolysed wastes as alternative nutritive agents in the standard components of the diet can increase the concentration of essential minerals for breeding of the CM.

3.5 Influence of diet on *Cydia pomonella* breeding

Table 6 presents the physico-chemical properties of the alternatives diets. The impact of these properties on CM growth is shown in Fig. 1.

Fig.1 demonstrates that BWW diets provided the best breeding (45-93 % hatching; 36-85 % larva; 16-66 % cocoon and 10-63 % moth) in comparison to POM diets (35-75 % hatching, 28-70 % larva, 12-58 % cocoon and 9-43 % moth). Among these diets, BWW-30-100-SF diet (composed of soya flour and BWW waste hydrolysis in 100 °C for 30 min) provided the best breeding results (93 % hatching, 85 % larva; 66 % cocoon and 63 % moth), which was higher than the control diet of Biotepp (90 % hatching; 80 % larva; 65 % cocoon and 62 % moth).

It is explained by the fact that BWW-100-30-SF diet contains higher nutrient concentrations (39.2 g l⁻¹ [carbohydrate], 35.7 g l⁻¹ [protein] and 16.8 g l⁻¹ [lipids]), lower viscosity (525 mPa.s), optimal moisture (32.66 %) and moderate pH (5.16) favourable for CM breeding in comparison to other diets (Table 6). The improved texture and high nutrient potential of this diet depends on the hydrolysis pretreatment and freeze-drying of BWW waste viscosity and particle size reduction by hydrolysis contributed to increased nutrient potential of the diet. BWW waste and SF resulted in a pH of 5 and especially loss of water suitable for growth of larva. According to the literature (Toba and Howell, 1991; Wiggins, 2004; Hansen and Anderson, 2006), these best diets improve larval breeding due to their excellent properties of texture, viscosity and high nutrient potential which facilitate their assimilation by larva. However, in our study, alkaline and

thermal-alkaline hydrolysed wastes provided poor larval breeding, although the results were excellent in terms of nutrient and rheology. The lower breeding rate may be attributed to alkaline conditions which affected and reduced hatching of eggs and larval growth as normal pH conditions for growth are 5-6.

4. Conclusion

The present study showed that BWW and POM hydrolysis increased nutrient potential and reduced the viscosity of the diet for optimal codling moth (CM) breeding. Hydrolysis resulted in reduction in solids of more than 15% (w/v) of BWW (reduction of $66.5 \pm 7 \text{ g l}^{-1}$ [TS] to $56 \pm 6 \text{ g l}^{-1}$ [TS] and $26 \pm 3 \text{ g l}^{-1}$ [SS] to $17 \pm 2 \text{ g l}^{-1}$ [SS]) and of more than 30 % (w/v) for POM (reduction of $45 \pm 5 \text{ g l}^{-1}$ [TS] to $28 \pm 3 \text{ g l}^{-1}$ [TS] and $15.5 \pm 2 \text{ g l}^{-1}$ [SS] to 8.5 g l^{-1} [SS]). The nutritive potential of the diet increased to more than 50% in terms of carbohydrates, proteins and lipids. Waste hydrolysis improved (reduction and rupture of the floc and particles) with the increase in treatment time (45 min) and higher temperature (100-121 °C). Codling moth breeding assay provided the best results of hatching (93%), larval breeding (85%), pupa production (70%) and moth (64%) production for diets produced using soya flour (SF) and BWW waste hydrolysis at 100 °C, for 30 min and without any variation in pH.

Acknowledgements

The authors are sincerely thankful to the natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, Canada Research chair), INRS-ETE and FQRNT (ENC) for financial support. We are grateful to BioTepp Inc. for providing us codling moth eggs for the research experiments. Thanks are also due to ADM-Ogilvie, Québec municipality, Barberie and Lassonde Inc. for providing us the wastes to perform the studies. The views and opinions expressed in this article are those of authors.

References

- Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR & Surampalli RY (2007) Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochem.* 42 (9): 1302-1311.
- APHA, AWWA & WEF (2005) Standard methods for the examination of water and Wastewater, 21st Edition.
- Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, Satoh H & Matsuo T (2001) Sludge hydrolysate as a carbons source for denitrification. *Water Sci. Technol.* 43 (1): 191-199.
- Bachelier G & Gavinelli R (1966). Cahier ORSTOM, série Pédologie, vol. IV(3).
- Barnabé S (2004) *Hydrolysis and partial oxydation of wastewater sludge as raw material to produce Bacillus thuringiensis HD-1*. PhD Thesis, INRS-ETE, University of Québec, Canada, pp 63-70.
- Barnabé S, Brar SK, Tyagi RD, Beauchesne I & Surampalli RY (2009) Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products - Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment* 407: 1471-1488.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD & Valero JR (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41, 323-342.
- Brar SK, Verma M, Valero JR, Tyagi RD & Surampalli RY (2008) Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2849-2857.
- Chu CP, Lin WW, Lee DJ, Chang BV & Peng XF (2002) Thermal treatment of waste activated sludge using liquid boiling. *Journal of Environ Engineering*: 1100-1103.
- Cohen AC (2004). Insect diet-Science and Technology. *CRC Press, US*. 293 pp.
- Dumais O (1999). La gastronomie en plein air, Québec Amérique, Montréal. p 148-149.
- Genc H & Nation JL (2004) An artificial diet for the butterfly *Phyciodes phaon* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Florida Entomol.* 87: 194-198.
- Gnepe JR, Brar SK, Tyagi RD & Valero JR (2011) Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 46: 1-12.
- Hansen JD & Anderson PA (2006) Mass rearing codling moths: improvements and modifications. *Journal of Entomology Society of British Columbia* 103: 33-36.
- MENV (2004). Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes. Critères de référence et normes réglementaires. Ministère de l'Environnement, Québec. 127p.

- Miron Y, Zêeman G, Van Lier JB & Lettinga G (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.
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107: 254-255.
- Nation JL (2001). *Insect Physiology and Biochemistry*. Boca Raton, Fla., CRC Press. 485 pp.
- Osborn TB & Mendel LB (1932) A modification of the Osborne-Mendel salt mixture containing only inorganic constituents. *Science*, 75:339-340.
- Penaud V, Delgènes JP & Moletta R (1999). Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enz. Microbial Technol.*, 25: 258-263.
- Perron V & Hébert M (2007). Caractérisation des boues d'épuration municipale—Partie I: Paramètres agronomiques. *VECTEUR environnement* 40 : 48-52.
- Pham TTH, Brar SK, Tyagi RD & Surampalli, RY (2010) Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrasonics Sonochemistry* 17: 38-45.
- Roux J-L (1994) Conserver les aliments, Comparaison des méthodes et des technologies des aliments. *Technique et Documentation – Lavoisier* : p 436-456.
- Schieder D, Schneider R & F- Bischof (2000). Thermal hydrolysis (TDH) as a pretreatment method for the digestion of organic waste. *Water Sci. Technol.* 41 (3): 181-187.
- Shanableh A & Jomaa S (2001). Production and transformation of volatile fatty acids from sludge subjected to hydrothermal treatment. *Water Sci. Technol.*, 44 (10): 129-135.
- Toba H H & Howell J F (1991) An improved system for mass-rearing codling moths. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 88: 22-27.
- Vlyssides AG & Karlis PK (2004) Thermal-alkaline solubilisation of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 91: 201-206.
- Vu KD, Tyagi RD, Valero JR & Surampalli RY (2009) "Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater", *Bioprocess Biosyst Eng* vol. 32: 511–519.
- Wiggins JC (2004) Diet composition and method for rearing insects. N° PUB, US 2004/0228947 A1.

Table 3.1: Experimental conditions and codes associated to every preliminary experiment

Wastes	pH $\pm$ 0.1	Temperature (°C)	Times (minute)	Codes
Brewery wastewater-BWW	Initial	80	15	BWW-80-15
			30	BWW-80-30
			45	BWW-80-45
		100	15	BWW-100-15
			30	BWW-100-30
			45	BWW-100-45
		121	15	BWW-121-15
			30	BWW-121-30
			45	BWW-121-45
	7	80	15	BWW7-80-15
			30	BWW7-80-30
			45	BWW7-80-45
		100	15	BWW7-100-15
			30	BWW7-100-30
			45	BWW7-100-45
		121	15	BWW7-121-15
			30	BWW7-121-30
			45	BWW7-121-45
	10	80	15	BWW10-80-15
			30	BWW10-80-30
			45	BWW10-80-45
		100	15	BWW10-100-15
			30	BWW10-100-30
			45	BWW10-100-45
		121	15	BWW10-121-15
			30	BWW10-121-30
			45	BWW10-121-45
Apple pomace sludge-POM	Initial	80	15	POM-80-15
			30	POM-80-30
			45	POM-80-45
		100	15	POM-100-15
			30	POM-100-30
			45	POM-100-45
		121	15	POM-121-15
			30	POM-121-30
			45	POM-121-45
	7	80	15	POM7-80-15
			30	POM7-80-30
			45	POM7-80-45
		100	15	POM7-100-15
			30	POM7-100-30
			45	POM7-100-45
		121	15	POM7-121-15
			30	POM7-121-30
			45	POM7-121-45
	10	80	15	POM10-80-15
			30	POM10-80-30
			45	POM10-80-45
		100	15	POM10-100-15
			30	POM10-100-30
			45	POM10-100-45
		121	15	POM10-121-15
			30	POM10-121-30
			45	POM10-121-45

Table 3.2: Physico-chemical parameters

Parameters	SIW (mg/Kg)	BWW (mg/Kg)	Pomace (mg/Kg)	WWS (mg/Kg)
pH±0.1	3.74	4.45	3.3	6.07
TS (g/L)	15.5±1.1	66.5±6	45±5	27.6 ± 1.5
SS (g/L)	4.4 ± 0.8	26.5±4	15.5±2	12.6±0.2
C _t (g/L)	15.3±1.6	42.28±3.5	14.04 ± 3	10 ± 0.6
N _t (g/L)	1.23± 0.5	4.5±1.1	3.18± 0.2	1.7
N _{org} (g/L)	0.82 ± 0.1	3.13±0.12	2.6± 0.5	1.2 ± 0.2
Protein (g/L)	5.1 ± 1.5	19.52± 2.1	16.1±1.3	7.8±1.4
Carbohydrate (g/L)	7.5±2.5	9.17±1.5	8.2±1.3	6.7±2.7
Lipid (g/L)	0.13±0.1	0.25±0.1	0.15±0.2	0.12±0.1
Trace elements for plants and animals				
Ca	13.21±1.3	28.05±3	25.05±2.5	61.35 ± 6.2
Co (34-150) [†]	0.0015±0.001	0.007±0.002	0.002±0.0002	0.56 ± 0.06
Cr(210-1060) [†]	0.0042±0.04	0.012±0.01	0.009±0.001	0.07±0.007
Cu (400-1000) [†]	0.016±0.03	0.034±0.003	0.0305±0.003	28 ± 3
K	17.2±2.1	35.2±4	31.07±3	84 ± 8
Mg	19.04±2	30.04±3	27.2±2.7	81.5±8
Mn	0.048±0.005	0.086±0.009	0.063±0.006	27.25 ± 3.3
Mo (5-20) [†]	0.001±0.0001	0.004±0.03	0.0018±0.0002	3.3±0.3
Na	28.05±3	78.61±7.9	45.71±4.6	622.5 ± 65
Ni (62-180) [†]	0.024±0.002	0.038±0.03	0.027±0.003	101 ± 10.5
P	15.5±1.6	55.04±6	49.04±4	138.3 ± 13.8
S	0.034±0.003	0.143±0.02	0.089±0.009	276.5 ± 27.7
Se (2-14) [†]	0.0115±0.001	0.0125±0.002	0.0092±0.0009	5.3±0.55
Si	0.0015±0.0002	0.005±0.0005	0.0037±0.0004	8.7±0.9
Zn(700-1850) [†]	0.02±0.002	0.0892±0.008	0.0772±0.001	1001.4 ± 100
Restricted contaminants				
Cd (3-10) [†]	0.003±0.0003	0.005±0.02	0.002±0.01	5.6 ± 0.6
Pb(150-300) [†]	0.0025±0.0003	0.003±0.02	0.0014±0.03	138.6 ± 13.9
Coagulatives				
Al	0.017±0.002	0.021±0.003	0.019±0.05	1758 ± 176
Fe	1.45±0.2	1.66±0.2	1.61±0.2	10782 ± 1080

mg/kg (dry weight)

± : refers to standard error

[†]Restricted concentration norms for wastewater sludge in Quebec (MENV, 2004)

Table 3.3: Study of the physical properties of the hydrolysis waste

Wastes	pH±0.1	TS (g/L)	SS (g/L)	Viscosity (mPa.s)
BWW-80-15	4.1	63	23	1369
BWW7-80-15	6.7	43	21	497
BWW10-80-15	9.3	25	17	210
BWW-80-30	4.06	61	22	1259
BWW7-80-30	6.2	40	20	444
BWW10-80-30	8.9	23.5	16	170
BWW-80-45	4.03	59	20	1182
BWW7-80-45	5.47	39	18	365
BWW10-80-45	6.57	23	15	130
BWW-100-15	5.7	60	20	1196
BWW7-100-15	7.01	41	19	512
BWW10-100-15	9.9	22	15	179
BWW-100-30	5.4	59	19	1085
BWW7-100-30	6.9	38	17	447
BWW10-100-30	9.87	21	14	138
BWW-100-45	5.24	57	18	987
BWW7-100-45	7.08	37	16	379
BWW10-100-45	9.83	20	13	121
BWW-121-15	6	58	19	878
BWW7-121-15	6.9	38	18	347
BWW10-121-15	9.8	21	13	176
BWW-121-30	5.5	57	18	797
BWW7-121-30	6.8	37	16	267
BWW10-121-30	9.4	20	13	109
BWW-121-45	5.9	56	17	675
BWW7-121-45	6.9	36	15	191
BWW10-121-45	9.1	18	10	67
POM-80-15	4.13	42	13	1119
POM7-80-15	6.47	33	19	457
POM10-80-15	9.7	10	41	200
POM-80-30	4.07	8	12	1009
POM7-80-30	6.01	31	9.5	394
POM10-80-30	8.6	18	7.6	140
POM-80-45	4.03	38	11	981
POM7-80-45	5.47	29	9	302
POM10-80-45	6.57	17	7.5	98
POM-100-15	4.13	42	13	1096
POM7-100-15	6.47	33	19	475
POM10-100-15	9.7	10	41	129.9
POM-100-30	4.07	8	12	982
POM7-100-30	6.01	31	9.5	407
POM10-100-30	8.6	18	7.6	101
POM-100-45	4.03	38	11	806
POM7-100-45	5.47	29	9	337
POM10-100-45	6.57	17	7.5	99
POM-121-15	4.03	40	11.7	848
POM7-121-15	6.32	30	9	279
POM10-121-15	7.72	18	7.5	186
POM-121-30	3.97	39	10	727
POM7-121-30	5.82	29	9	217
POM10-121-30	6.72	17	7	89
POM-121-45	3.93	38	10	665
POM-121-45	5.32	28	8.5	141
POM10-80-45	5.72	16	7	57

TS and SS standard error: ± 10% - 13%

Viscosity standard error: ±11%-15%

Table 3.4: Analysis of the nutrient potential of the hydrolysis waste

Wastes	C _t (g/L)	N _t (g/L)	NH ₄ ⁺ (g/L)	Protein (g/L)	Carbohydrates (g/L)	Lipids (g/L)
BWW-80-15	37.3	3.9	0.667	20.21	11.17	0.143
BWW7-80-15	35.86	3.7	0.659	19	10.15	0.127
BWW10-80-15	32.3	3.4	0.644	17.23	8.7	0.065
BWW-80-30	34.69	3.7	0.614	19.29	12.19	0.137
BWW7-80-30	32.93	3.5	0.598	18.14	11.62	0.106
BWW10-80-30	29.5	3.2	0.575	16.41	9.11	0.053
BWW-80-45	29.78	3.3	0.597	16.89	13.2	0.117
BWW7-80-45	27.16	3.1	0.560	15.88	12.77	0.093
BWW10-80-45	24.87	2.8	0.534	14.16	10.39	0.047
BWW-100-15	35.2	3.7	0.456	20.3	10.3	0.15
BWW7-100-15	33.31	3.5	0.441	19.12	9.2	0.122
BWW10-100-15	28.43	3.2	0.437	17.27	7.1	0.076
BWW-100-30	30.5	3.5	0.449	19.07	11.33	0.127
BWW7-100-30	28.7	3.3	0.423	17.98	10.2	0.093
BWW10-100-30	25.71	3	0.401	16.24	8.13	0.053
BWW-100-45	25.23	3.2	0.436	17.28	12.4	0.094
BWW7-100-45	23.38	3	0.429	16.07	11.34	0.085
BWW10-100-45	20.56	2.76	0.390	14.8	9.6	0.044
BWW-121-15	26.41	3.31	0.423	18.04	8.1	0.139
BWW7-121-15	24.64	3.1	0.410	16.81	9.14	0.117
BWW10-121-15	21.5	2.8	0.417	14.89	10.2	0.069
BWW-121-30	23.87	3.2	0.414	17.41	8.2	0.125
BWW7-121-30	21.68	3.0	0.400	16.25	9.2	0.091
BWW10-121-30	18.72	2.7	0.392	14.43	10.3	0.056
BWW-121-45	18.84	2.97	0.405	16.03	8.6	0.095
BWW7-121-45	16.9	2.8	0.397	15.02	9.6	0.077
BWW10-121-45	13.6	2.56	0.389	13.57	10.6	0.035
POM-80-15	30	3.5	0.753	17.17	9.82	0.13
POM7-80-15	28	3.31	0.74	16.06	8.92	0.103
POM10-80-15	25	3	0.729	14.19	5.53	0.052
POM-80-30	27	3.3	0.716	16.15	10.77	0.12
POM7-80-30	25	3.1	0.698	15.013	9.33	0.09
POM10-80-30	23	2.8	0.662	13.36	6.48	0.048
POM-80-45	25	3	0.688	14.45	11.16	0.106
POM7-80-45	23	2.8	0.668	13.33	10.53	0.087
POM10-80-45	20	2.5	0.636	11.65	7.89	0.043
POM-100-15	31.96	3	0.892	13.18	8.26	0.12
POM7-100-15	29.41	2.8	0.861	12.12	7.98	0.099
POM10-100-15	26.3	2.5	0.851	10.31	6.48	0.05
POM-100-30	28.69	2.8	0.864	12.1	9.41	0.115
POM7-100-30	26.44	2.6	0.853	10.92	8.04	0.093
POM10-100-30	23.02	2.3	0.841	9.12	7.61	0.046
POM-100-45	21.13	2.6	0.835	11.03	10.69	0.104
POM7-100-45	19.48	2.4	0.821	9.87	9.25	0.079
POM10-100-45	16.53	2.1	0.816	8.025	8.78	0.042
POM-121-15	22.82	2.4	0.781	10.12	8.11	0.12
POM7-121-15	20.71	2.2	0.774	8.92	7.09	0.096
POM10-121-15	17.99	2	0.762	7.74	6.34	0.048
POM-121-30	20.34	2.3	0.776	9.53	7.13	0.114
POM7-121-30	18.18	2	0.755	7.78	5.98	0.091
POM10-121-30	15.96	1.7	0.689	6.32	5.35	0.044
POM-121-45	16.39	2.1	0.675	8.91	6.15	0.1
POM7-121-45	14.89	1.8	0.664	7.1	5.1	0.077
POM10-121-45	10.31	1.6	0.643	6	4.16	0.039

Standard error: ± 10% – 13%

Table 3.6: Characteristics of the diets produced with hydrolysis waste

Diets	pH±0.1	RH (%)	Viscosity (mPa.s)	Carbohydrates (g)	Proteins (g)	Lipids (g)
Standard	5.09	40.17	142	4.2	3.71	2
BWW-pH7	5.46	31.89	470.5	3.2	2.7	1
BWW-pH10	4.84	25.51	303	8.9	3.4	1.1
BWW	5.2	35.8	770.5	3.2	2.7	1
BWW+SF	4.9	29.2	823	5.6	5.1	2.4
BWW-80-30	4.91	30.44	506	16	13.5	5
BWW-100-30	4.96	25.98	435	22.4	18.9	7
BWW+SF-80-30	5.09	35.38	641	28	25.5	12
BWW+SF-100-30	5.16	32.66	525	39.2	35.7	16.8
POM-pH7	5.44	39.49	308	6.7	5.8	2.6
POM-pH10	3.9	41.33	260	3.25	2.08	0.91
POM	3.9	35.7	460	3	2.08	0.8
POM-SF	4.1	38.9	492	5	4.48	2.31
POM-80-30	3.94	40.35	368	15	10.4	4
POM-100-30	3.62	50.71	383	21	14.56	5.6
POM+SF-80-30	4.19	38.37	389	25	22.4	11.55
POM+SF-100-30	4.55	32.4	392	35	31.36	16.17
POM+BWW	4.3	21	987	6.45	4.78	1.91
POM+BWW-80-30	4.63	24.42	396	32.25	23.9	9.55
POM+BWW-100-30	4.73	33.28	399	45.15	33.46	13.37

RH (Humidity lost) standard error : ± 10% - 15%

Viscosity standard error : ± 11% - 18%

Nutrient standard error : ± 10 % - 12%

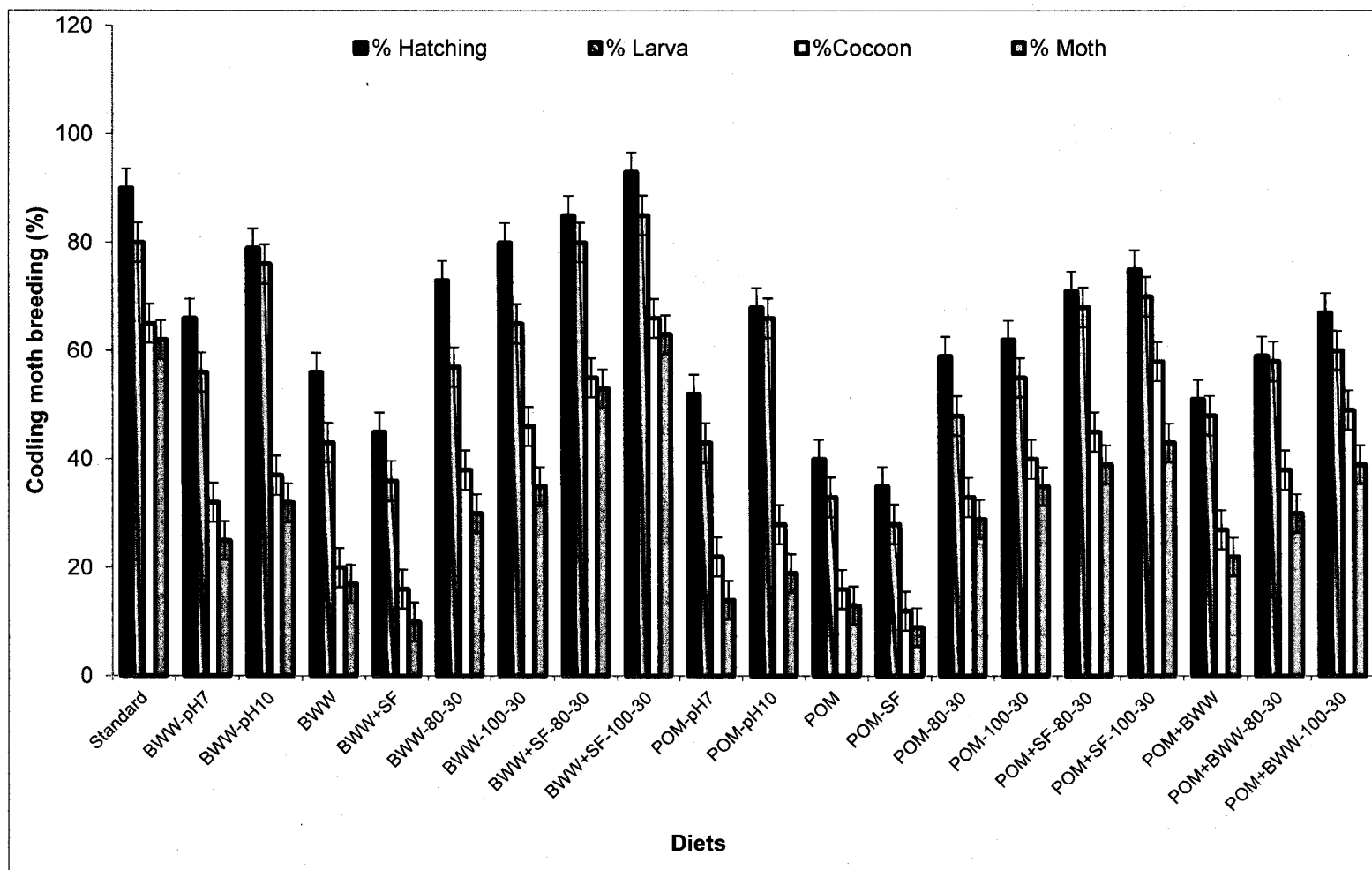


Figure 3.1: Influence alternatives diets on codling moth breeding.

CHAPITRE IV :

Activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella* élevées sur les diètes à base des rejets agro-industriels

Chapitre IV - Partie I

Activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella* élevées sur des diètes à base des rejets agro-industriels hydrolysés

*Enzymatic activity of *Cydia pomonella* larva reared on diets produced with agro-industrial hydrolysis wastes*

Jean R. Gnepe¹, Satinder K. Brar¹, Rajeshwar D. Tyagi^{1*}, José R. Valéro¹

¹INRS-ETE, Université du Québec, 490, de la Couronne, Québec, Canada G1K 9A9

Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (2011) (soumis)

RÉSUMÉ

Les caractéristiques physico-chimiques et le potentiel nutritif des eaux usées de micro-brasseries (EMB) et des boues d'industrie de jus de pomme (POM) ont été comparés. Le prétraitement d'hydrolyse effectué à 100 °C, pendant 30 minutes, a contribué à augmenter le potentiel nutritif (de 600 % pour les protéines, glucides et lipides présents dans les rejets d'EMB et de POM hydrolysés) et à améliorer la viscosité (réduit de 770,5 à 435 mPa.s pour EMB et de 460 à 383 mPa.s pour POM) des rejets. L'utilisation de ces rejets comme agents nutritifs alternatifs aux composants standard (Farine de soja, Germe de blé et extrait levure) de la diète a permis de rentabiliser l'élevage du carpocapse de pomme (CP).

La diète à base de rejet d'eaux usées de micro-brasseries hydrolysées (EMBH+FS) a fourni les meilleurs résultats en terme de masse de nutriments assimilés (2.071 mg protéines, 2.274 mg glucides et 0.974 mg lipides) et d'élevage (93 % d'éclosion, 85% larves, 76% chrysalides et 70% adultes).

L'activité enzymatique (protéase, amylase et lipase) a été évaluée des larves du 5^{ème} stade ont été élevées sur les diètes à base d'eaux usées de micro-brasseries hydrolysées où les germes de blé et les extraits de levure sont remplacés à 100% (EMBH+FS) et de rejet de jus pomme où les germes de blé et les extraits de levure sont remplacés à 100% (POMH+FS) sont jugées les meilleures sur la base des résultats des nutriments et des tests d'élevage.

Les analyses montrent que la diète EMBH+FS a fourni les meilleur résultats de l'activité enzymatique (59,7 UI/mL protéase, 2,9 mg/L amylase et 1,93 U/mg enzy lipase), relativement aux taux de protéines (35,7 mg), glucides (39,2 mg) et lipides (16,8 mg) consommés sur cette diète par rapport aux diètes POMH+FS et à la diète standard.

Mots clés: Rejets agro-industriels, nutriments, larves, *Cydia pomonella*, hydrolyse, activité enzymatique

ABSTRACT

This study compares the physico-chemical characteristics and the nutrient potential of brewery wastewater (BWW) and apple juice industry sludge referred to as pomace (POM). The hydrolysis pretreatment was carried out at 100 °C for 30 minutes and it contributed to enhancement in the nutrient potential (almost 600 % for the proteins, lipids and carbohydrates present in hydrolyzed brewery wastewater and pomace) and improved the viscosity (decreased from 770.5 to 435 mP.s for BWW and from 460 to 383 mPa.s for POM) of the waste. The use of these wastes as alternative nutrient supplier by replacing the standard components (soya flour, wheat germ and yeast extract) allowed the possibility of producing a suitable diet for codling moth (CM) larvae. The brewery wastewater hydrolyzed diet (BWWH+SF) supplied the best results in terms of the mass of assimilated nutrients (2.071 mg proteins, 2.274 mg carbohydrates and 0.974 mg lipids) with the breeding efficiency as follows: 93 % hatching, 85 % larvae, 76 % cocoon and 70 % adult.

Further, the evaluation of the enzymatic activity (protease, amylase and lipase) of the 5th instars larvae breeding on brewery wastewater where wheat germ and yeast extract were replaced at 100% rate (BWWH+SF) and hydrolyzed pomace where wheat germ and yeast extract were replaced at 100% rate (POMH+SF) were considered efficient based on nutrient and breeding results. Of the two, BWWH+SF the diet supplied the best results of the enzymatic activity (59.7 UI/mL protease, 2.9 mg/L amylase and 1.93 U/mg lipase) and consumption rates of proteins (451.79 mg/kg), carbohydrates (396.43 mg/kg) and lipids (91.07 mg/kg) consumed on these diets as compared to POMH+SF and standard diet.

Keywords: Agro-industrial wastes, nutrients, larvae, *Cydia pomonella*, hydrolysis, enzymatic activity

1. Introduction

Le carpocapse de pomme (CP), *Cydia pomonella* (L.) est un ravageur des fruits à pépins (ex. Pomme) et des noix (Barnes 1991; Lacey et al. 2006) des régions tempérées et tropicales. Ce lépidoptère natif de l'Europe et de l'Asie a été introduit en Amérique du Nord en 1750 (Lacey et Unruh 2007). Durant leur alimentation, ces espèces ont un impact négatif sur l'économie des vergers (ex. infestations de 60 % des poires, de 80% des pommes et de 95% des noix) (Brar 2008). Pour lutter contre ces lépidoptères, l'utilisation d'un contrôle biologique par le granulovirus est utilisée en remplacement des insecticides chimiques qui sont néfastes pour l'environnement et la santé humaine (Lacey et Siegel 2007; Lacey et Arthurs 2005; Reuveny et Cohen 2007). Mais, ce bio-insecticide est produit à partir des larves infectées cultivées sur des diètes. De plus le coût de ces diètes, qui représente 40 % du biopesticide est élevé à cause du prix de ces ingrédients qui supporte 35 % le coût de sa production total. Pour résoudre cette problématique, une diète à base des rejets agroindustrielles (eaux usées micro-brasseries-EMB et de boues de pomme-POM) hydrolysés, comme agents nutritifs alternatifs a été produite. Car des études ont montré que l'hydrolyse des rejets agroindustriel, plus riche en nutriment et moins toxique en métaux que les boues municipale (Brar et al. 2006; Adjalle et al. 2007; Vu et al. 2009), permet d'augmenter leur biodisponibilité en nutriments et d'améliorer leur rhéologie pour la production des produits en valeur ajouter (PVA) (Schieder et Schneider 2000; Vlyssides et Karlis 2004; Barnabé et al. 2009; Pham et al. 2010).

Le suivi de la consommation des nouvelles diètes produites a été effectué à travers une étude du bilan de masse des nutriments assimilés et surtout une analyse de l'activité enzymatique observé chez les larves du stade 5 du CP. D'après la littérature, les enzymes présentes dans le tube digestifs des larves d'insectes permettent de déterminer la quantité de nutriments et le type de nutriment assimilé par la larve et présent dans la diète artificielle (Stamopoulos et al. 1993; Moyano et al. 1996; Alarcon et al. 2002).

Cette étude consiste à définir les enzymes digestifs les plus prépondérants chez les larves adultes (stade 5) en utilisant des techniques biochimiques et histochimiques afin d'obtenir une perspective plus complète. À cet effet, deux aspect différents sont à considérer : 1) La quantification des différentes enzymes digestifs (Protéase, amylase et lipase) durant le stade larvaire et adulte en relation directe avec le bilan de masse des nutriments assimilés par les larves; 2) Évaluer l'influence des diètes à base des rejets hydrolysés sur la croissance des larves et production des enzymes d'hydrolyse des rejets et des traitements effectués sur

chaque rejet. Cette diète à base des rejets doit être plus économique, plus écologique et plus efficace en culture du CP que la diète standard utilisée.

2. Matériel et méthodes

2.1 Carpocapse de pomme

Les œufs du Carpocapse de pomme, *Cydia pomonella* (L) élevés au laboratoire de l'INRS-ETE (Université de Québec) sont fournis par la l'industrie BioTepp Inc. (Cap-Chat, Québec, Canada). Les larves et les adultes sont élevés sur les diètes alternatives dans une chambre environnementale stérile (Gnépé et al., 2011).

2.2 Milieux de culture utilisés pour l'élevage des larves du Carpocapse de pomme (CP)

Les diètes utilisées pour l'élevage des larves du CP sont composées: (1) La diète contrôle (diète standard de BioTepp Inc.), constituées d'ingrédients semi-synthétiques (6.85 g de farine de soja, 1.6 g d'extrait de levure et 2.2 germe de blé), de substances synthétiques (0.55 g de Vitamine Van der Zan't, 0.99 g de mixture de sel Wesson, 1 g de sucrose, 0.5 g d'acide ascorbique, 1.3 g de methyl-p-hydroxy benzoate) et 50 ml d'eau milli-Q stérile; (2) Les diètes alternatives, composées soit des eaux usées de la microbrasserie (EMB) la Barberie (Québec) où des boues d'industries de jus de pomme (POM) de Lassonde Inc., Rougemont (Québec) hydrolysés où non et lyophilisés par la suite, comme substituts des ingrédients semi-synthétiques.

L'élevage des larves du CP sont réalisés sur les diètes alternatives produites avec les rejets de POM et EMB. Les masses des rejets nécessaires pour remplacer les ingrédients de la diète standard sont déterminées par l'Équation (1).

$$\frac{\text{Masse de l'ingrédient} \times \text{Concentration du nutriment dans l'ingrédient}}{\text{Concentration du nutriment dans le rejet}} \quad (1)$$

Durant cette étude, les paramètres d'élevages (Équations 2, 3, 4), présentés au Tableau 3, ont permis de tester 3 types diètes: Les diètes produites avec les rejets de microbrasserie (EMB; EMB+FS; EMBH; EMBH+FS), les diètes produites avec les rejets de pomme (POM; POM+FS; POMH; POMH+FS) et les diètes produites avec les deux rejets (EMB+POM; EMBH+POMH).

$$\text{Taux d'éclosions} = \frac{\text{Oeufs éclos}}{\text{Oeufs totaux}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Taux de croissance des larves} = \frac{\text{Larves adultes}}{\text{Totale des oeufs}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Taux de croissance des adultes} = \frac{\text{Papillons adultes}}{\text{Totale des oeufs}} \times 100 \quad (4)$$

2.3 Les paramètres physico-chimiques

Les concentrations en solide totaux (ST), en matières en suspensions (MES) et en métaux (minéraux) des rejets agroindustriels et municipaux sont déterminées selon les méthodes standards (MENVIQ 1989; APHA et al. 2005; MENV 2007).

La concentration des protéines (P) dans les échantillons a été déterminée par la multiplication de l'azote organique (N_{org}) présent par le facteur 6.25. L'azote organique a été obtenu par la différence entre l'azote minérale [NH_4^+] et l'azote totale (NTK) présent dans les rejets et les diètes selon les méthodes standards. Les mesures de l'azote totale (N_t) et carbone totale (C_t) dans les rejets ont été analysées en utilisant un analyseur d'azote (Leco CINS-932, US) en accord avec les méthodes standards (APHA et al., 2005; MENV, 2007). Les glucides solubles (G) des rejets et des diètes, éléments essentiels pour la source d'énergie, la mobilité et la formation de la cuticule des insectes sont analysées en utilisant les méthodes de l'anthrone (Morris 1948; Bachelier et Gavinelli 1966).

Les lipides (L) sont déterminés dans 2 g des rejets suivant les méthodes gravimétriques par l'extraction par Micro-onde (MARS RX, CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Cette technique, plus précise que la méthode du Soxhlet, permet l'analyse de faibles volumes (20 à 50 ml) de mixture de solvant d'acide d'éthyle cyclohexane/acétique dans un temps court (50 min à 60 min) à 80°C.

2.4 Bilan de masse des nutriments des diètes assimilées par les larves

Le bilan de masse de la diète consommée a été évalué suivant le protocole établi par Gnepe et al. (2011). La masse totale (M_t) de la diète est pesée au début de l'expérience (Temps=0 jour), juste avant l'utilisation des œufs pour l'élevage. La masse résiduelle (M_r) de la diète est évaluée

après 28 jours d'élevage (stade adulte des larves). La masse de la diète consommée (M_c) par les larves est fournie par la différence entre la M_t et la M_r . La M_c est constituée de la masse de l'excréta (M_e) des larves et la masse de la diète assimilée (M_a) par les larves durant leur croissance. La quantité et la concentration des nutriments présent dans les différentes diètes produites sont exprimées suivants les Équations:

$$M_c = M_t - M_r \quad \text{et} \quad M_a = M_c - M_e \quad (5)$$

$$\text{Nut}_c = \text{Nut}_t - \text{Nut}_r \quad \text{et} \quad \text{Nut}_a = \text{Nut}_c - \text{Nut}_e \quad (6)$$

Nut_t = les nutriments (protéines, lipides et glucides) présents dans la diète totale juste avant l'éclosion des œufs; Nut_r = les nutriments présents dans la diète résiduelle après les 28 jours de croissance des larves; Nut_c = Les nutriments consommés par les larves après 28 jours de croissance; Nut_a = Les nutriments assimilés par les larves après 28 jours de croissance; Nut_e = Les Nutriments (protéines, lipides et glucides) présents dans les excréta par les larves après 28 jours de croissance.

Basé sur la consommation et l'assimilation par les larves des nutriments présents dans les diètes, le bilan de masse a été calculé suivant l'Équation 7:

$$\sum \text{Nut}_t = \sum (\text{Nut}_c + \text{Nut}_r) \quad \text{et} \quad \sum \text{Nut}_c = \sum (\text{Nut}_a + \text{Nut}_e) \quad (7)$$

$\sum \text{Nut}_t$: Quantité des nutriments (protéines, lipides ou glucides) dans la diète totale;

$\sum \text{Nut}_c$: Quantité des nutriments consommés par les larves après 28 jours;

$\sum (\text{Nut}_c + \text{Nut}_r)$: Quantité net des nutriments présents dans la diète résiduelle et consommé par les larves;

$\sum (\text{Nut}_a + \text{Nut}_e)$: Quantité net des nutriments consommés et excrétés par les larves.

2.5 Activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella*

L'étude des enzymes s'est inspirée de la méthode déjà utilisée par Moyano et al. (1996) portant sur les protéases des larves du poisson gilthead seabream (*Sparus aurata*). Un nombre de 10-15 larves (15 mg / ml) du carpocapse de pomme (CP) est homogénéisé à froid dans une solution tampon de Tris-HCl 50 mM à pH 7,5. Les extrait obtenus après centrifugation (12500 x g; 30 min à 4 °C) sont filtrés sur les papiers filtre (934 AH Whatman de 0.45 mm) et ensuite centrifugé (2000 x g, 2 min). Le surnageant conservé à «-20 °C» est utilisé pour l'analyse des enzymes.

L'activité des protéases des larves du CP a été mesurée par la méthode de Kunitz modifiée par Walter, à partir de la caséine (1%) dissous dans la solution tampon de Tris/HCl 150 mM pH 9 (Stauffer 1989). Les échantillons (50 µl) d'enzymes préparés sont mélangés avec 0,5 ml de la solution tampon à 25°C. Après 30 min et 37 °C d'incubation au bain marie, la réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 ml 12 % acide trichloracétique (TCA), et après 1 h de conservation à 4°C, la solution est mélangée et centrifugée dans des tubes d'ependorf pendant 5 min à 6500 x g. Le surnageant est séparé et l'absorbance lue à 280 nm a été enregistrée. La tyrosine pure a été utilisée comme standard et une unité d'activité d'enzyme a été définie comme la quantité d'enzyme catalysant la formation de 1 µg de tyrosine par minute.

L'activité amylolytique (amylase) a été mesurée selon la méthode de Miller (Miller 1959; Zouari et Jaoua 1999). Un pour cent d'amidon (0,5 ml) de la solution tampon Na-acétate 50 mM à pH 6 a été mélangée avec 0,5 ml d'échantillon de larves approprié dilué obtenu suivant la méthode décrite plus haut. Ces échantillons sont incubés pendant 30 min à $40 \pm 0,1$ °C. La réaction a été arrêtée avec 3 ml de solution de DNS (3,5-acide dinitrosalicylique) qui a été bouillie pendant 5 min. Une quantité de 20 ml d'eau ultra pure a été ajoutée dans le milieu de la réaction et l'absorbance a été déterminée à 545 nm. Les blancs sont préparés avec l'échantillon d'enzyme inactivée traitée pendant 5 min dans de l'eau bouillante. Une unité d'amylase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 mg de glucose/min sous les conditions expérimentales. Les valeurs présentées sont la signification de 3 répétitions des analyses d'échantillons de 2 expériences séparées $\pm$ SE.

La lipase a été mesurée en accord avec la méthode «EC 3.1.1.3» du test standard enzymatique. L'huile d'olive 11% (2 ml) est ajoutée dans les 2 lots de tubes d'essai (test d'échantillons et le blanc de chaque échantillon préparé) et équilibré à 37 °C. Le surnageant (0,2 ml) des échantillons de larve préparée comme celui des protéases, mais avec la solution de tampon de potassium phosphate 20 mM, est ajouté uniquement dans le tubes à essais. Les blancs sont préparés en même que les tests des échantillons. Les échantillons sont mélangés par inversion et incubés à 37 C pendant 15 min. Ensuite le TCA (2 ml) est ajouté pour les 2 lots de tubes. La quantité de 0,2 ml d'échantillon est ajoutée uniquement dans le lot du blanc. Après mélange par inversion, les échantillons des 2 lots de tubes sont filtrés sur un filtre 934 AH wathman 0,45 diamètre. Les deux même lots de tubes sont préparés, 0,5 ml du surnageant d'échantillons obtenue est ajouté dans chaque tube. Ensuite 3 ml de la solution de coloration violet est ajouté pour colorer et arrêter la réaction. La solution est mélangée et incubé à 37°C

for 15 minutes. Les échantillons tests et les blancs préparés sont lues au spectrophotomètre à 545 nm.

2.6 Analyse statistique

Les analyses des données statistiques et les erreurs standards ont été effectuées par l'analyse de variance (ANOVA) en employant le logiciel, STATISTICA version 8 (Statsoft.com). Le degré de confiance pour cette étude a été fixé à 0,05.

3. Résultats et discussion

3.1 Influence de l'hydrolyse sur le potentiel nutritif des boues agroindustrielles

L'observation du Tableau 1 montre que l'hydrolyse a augmenté le potentiel nutritif des rejets de POM et d'EMB par rapport aux rejets non traités. Le traitement d'hydrolyse s'est effectué durant 30 minutes avec une température de 100 °C, du fait que ces conditions, ont fourni de meilleurs résultats par rapport aux autres températures (80 et 121 °C) et temps (15 et 45 minutes) d'hydrolyse utilisés dans la littérature (Barnabé et al. 2009; Pham et al. 2010). Le traitement d'hydrolyse s'effectuant à 100 °C, permet la lyse des floccs, particules de MES et des cellules sous l'effet de la pression sans affecter et dénaturer les éléments nutritifs (Protéines, lipides, glucides et minéraux) qui sont libérés et bio disponibles dans les milieux hydrolysés utilisés pour la production des diètes. Le temps de 30 min améliore suffisamment le processus d'hydrolyse qui se réalise totalement. Cette hydrolyse entraîne la minéralisation des éléments organiques en CO₂, H₂O, en protéines, en peptides, nitrates et éléments inorganiques (azote minérale, sucres et minéraux soluble) par des réactions d'oxydation et de gazéification (Miron 2000; Shanableh et Jomaa 2001). Par contre, l'hydrolyse effectuée à température élevée (121°C) affecte et dénature certains nutriments (Protéines, et lipides) dans les rejets hydrolysés qui sont transformés en peptides, amines, ammoniacque, nitrate et nitrite (Penaud 1999; Aravinthan 2001). Cela provoque aussi la saponification des lipides et l'hydrolyse des acides ribonucléiques (la solubilisation de la membrane).

Par contre, la concentration en glucide n'est pas affectée, car résiste mieux à l'exposition de la chaleur. Les conditions optimales pour prétraitement d'hydrolyse après les analyses sont de 100 °C et 30 min.

Le Tableau 1 présente de façon générale, une diminution de la concentration en ST, MES, de la viscosité et des lipides des deux rejets (EMB et POM). Pour ces mêmes rejets, les résultats observés montrent une augmentation des C_t, des N_t, des protéines et des glucides après l'hydrolyse. De plus, le Tableau 1 montre qu'après le traitement d'hydrolyse, les rejets d'EMB ont encore fourni les résultats les plus élevés en ST (59 ± 6 g/L), MES (19 ± 2 g/L), viscosité (685 ± 71 mPa.s), C_t ($30,5 \pm 3$ g/L), N_t ($4,5 \pm 0,5$), protéines ($20,8 \pm 2$ g/L), glucides ($31,3 \pm 3,1$ g/L) et lipides ($0,13 \pm 0,02$).

L'hydrolyse a permis la biodisponibilité des nutriments dans les rejets et a réduit la viscosité et la taille des particules. L'utilisation de ces rejets comme agents nutritifs peut améliorer l'élevage des larves.

3.2 Influence des diètes alternatives sur la croissance de *Cydia pomonella*

Le Tableau 2 présente les propriétés physico-chimiques des diètes alternatives à base de rejets hydrolysés ou non hydrolysés susceptibles d'influencer le développement du carpocapse de pomme (CP).

La Tableau 3 montre que les diètes à base d'EMB ont fourni les meilleures élevages (45-93 % d'éclosions; 36-85 % larves; 16-76 % chrysalides et 10-70 % adultes) par rapport aux diètes à base de POM (35-75 % éclosions, 28-70 % larves, 12-58 % chrysalides et 9-43 % adultes). Parmi ces diètes, la diète EMBH+FS a fourni de meilleurs résultats de l'élevage (93 % éclosions, 85 % larves, 76 % chrysalides et 70 % adultes), plus intéressants que ceux de la diète standard de Biotepp (90 % éclosions, 80 % larves, 65 % chrysalides et 62 % adultes). Cela s'explique par le fait que la diète EMBH+FS contient des concentrations nutritives très élevées (39,2 g/l glucide, 35,7 g/L protéine et 16,8 g/L lipide), une rhéologie (525 mPa.s), un taux d'humidité (32,7 %) et un pH (5,16) très favorable à la culture du CP par rapport aux autres diètes à base de rejets (Tableau 2). La texture améliorée et la richesse nutritive de cette diète dépend en majorité du prétraitement d'hydrolyse et de lyophilisation du rejet d'EMB et surtout de l'apport de la farine de soja (FS), très riche en nutriment et qui joue un rôle d'absorbant d'eau. La réduction de la viscosité et des tailles de particules par l'hydrolyse a contribué à augmenter le potentiel nutritif de la diète. Le rejet d'EMB et la FS ont contribué à maintenir le pH des diètes autour de 5, et surtout une perte d'humidité appropriée qui a offert à la diète une densité de masse intéressante pour la croissance des larves.

La présence d'une grande quantité d'eau dans la diète, dilue la concentration des nutriments (glucides, protéines, lipides et minéraux) dans la diète et influence la consistance physique (densité et viscosité) et le pH des diètes. Ceci a un impact néfaste sur la croissance du Carpocapse de pomme. Les diètes sont produites avec une quantité adéquate, pour permettre leur assimilation parfaite et favoriser le développement harmonieux des lépidoptères (Arijs et De-Clercq 2004; Wiggins 2004).

3.3 Bilan de masse nutritif des larves de *Cydia pomonella*

Le Tableau 4 présente la quantité de diète assimilée par les larves durant leur croissance. Par contre le Tableau 5, montre les résultats se rapportant aux concentrations de nutriments assimilés par ses larves au cours de leur croissance.

L'observation de ces Tableaux, montre que la diète EMBH+FS a fourni les résultats les plus élevés de masse de diète assimilées (2,9 mg) et de nutriments assimilées (2,27 mg glucides, 2,07 protéines et 0,97 mg lipides) par rapport aux autres diètes à base des rejets. Ces valeurs plus élevées que celles de la diète standard (3,5 mg diète assimilée; 0,29 mg de glucide, 0,26 mg protéines et 0,14 mg lipides) justifient l'excellent résultat de culture de *Cydia pomonella* obtenu sur cette diète au Tableau 2. Ces résultats intéressants sont dus à la capacité nutritive (protéine, glucides et lipides) et physique (ST et MES) plus élevée pour les rejets d'EMB (Tableau 1) qui confirme que ce rejet est une bonne source de nutriments pour la culture du CP. Les résultats observés sur cette diète s'expliquent par le fait que la farine de soja (FS) et le rejet d'EMB hydrolysé et séché agissent comme absorbant qui donne une consistance à la diète à cause des fibres présentes. De plus, la FS fournit une concentration élevée en glucide et protéines par rapport aux autres ingrédients (Germe de blé et extrait de levure). Ce composant important dans la diète des insectes, est essentiel pour leur croissance (Chapman 1998; Genc 2006). Bien que les lipides soient présents en faible concentration dans les diètes alternatives, ils sont suffisants pour supporter la croissance des larves. Ainsi, la faible assimilation des lipides est en concordance avec le fait que les lépidoptères consomment très peu de lipides pour leur croissance (Johnson et Felton 2001; Nation 2001). Comparée à la diète de Hansen et Anderson (2006) où 4,5 g de diète est importante pour élever une larve adulte de *Cydia pomonella*, la masse (9,8-11 g) de la diète produite dans cette étude supporte plus de 10 larves, ce qui est plus rentable. De plus, les résultats montrent que plus la larve assimile la diète consommée, moins les excréments sont rejetés, et ceci permet de conserver la majorité des éléments nutritifs importants pour leur croissance. La balance nutritive est très importante pour les insectes pour deux raisons: a) Une nutrition déséquilibrée nécessitera la consommation d'une quantité excessive de nourriture pour obtenir la quantité minimum de nutriments essentiels pour la croissance des insectes; b) Les relations métaboliques et biochimiques entre les composants, limitant l'assimilation des nutriments et fournissant les proportions sont nécessaires (Chapman 1998).

Aussi, pour une excellente croissance des larves, l'action des enzymes du tube digestif sur la digestion des nutriments évalués et du bilan nutritifs des larves de *Cydia pomonella* sont étudiées dans la section suivante.

3.4 Activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella*

L'évolution des équipements de la digestion d'enzyme des larves matures (après 24-28 jours) a été étudiée et présentée au Tableau 6. Cette analyse permet de constater l'évolution progressive des protéases, des amylases et des lipases chez les larves de *Cydia pomonella*. La mesure de l'activité enzymatique des larves observée s'est effectuée sur un échantillonnage représentatif (10-15 larves) pour toutes les diètes. Ces résultats sont plus élevés (2,9 mg/L amylase, 59,66 UI/ml et 1,93 U/mg enzy) pour les larves cultivées sur la diète EMBH+FS par rapport aux autres diètes et à la diète contrôle surtout (2,60 mg/L amylase, 53,7 UI/ml et 2,03 U/mg enzy). Bien que, les larves d'EMBH+FS ont une masse (24 mg) et une taille (2-3mm), tous deux inférieurs à celui de la diète contrôle (27 mg de masse et 2,2-3,2 mm de long), la quantité d'enzymes sécrétée par ces larves est plus importante que celle sécrétée par les larves de la diète contrôle. Cela est dû au fait que la quantité de nutriments assimilés (Tableau 4) par les larves élevées sur la diète EMBH+FS est plus important que celle assimilée par les larves élevées sur la diète contrôle. Aussi, la diète EMBH+FS possédant un taux plus élevé de nutriments (protéines, lipides et glucides) entraîne une sécrétion plus élevée d'enzymes (protéase, amylase et lipase) afin de permettre la digestion des nutriments par les larves durant leur croissance. Ce taux d'enzymes en relation avec le bilan de masse des nutriments assimilés détermine aussi que la quantité de nutriments est plus élevée dans la diète EMBH+FS et dans le rejet EMB que dans les autres diètes alternatives et le rejet de POM.

Ces résultats sont en accord avec les excellents résultats d'élevage observés sur la diète EMBH+FS (85% Larves) par rapport aux autres diètes et à la diète contrôle (80%). Ainsi, l'analyse des enzymes des extraits intestinaux des larves indiquent que la diète ingérée a un rôle plus qualitatif que quantitatif dans la sécrétion de ces enzymes digestifs vis-à-vis du fonctionnement des insectes (Moyano, 1996).

L'étude du bilan de masse des nutriments montre que la concentration élevée de l'élément nutritif dans la diète conduit à une sécrétion élevée d'enzymes propres à digérer ce nutriment chez les larves. Ainsi, la concentration en glucides étant la plus élevée et la concentration en

lipides étant la plus faible dans la diète expliquent le fait que la quantité des amylases est la plus élevée et que la quantité de lipases est la plus faible en générale.

Ce qui rentabilise énormément la culture. Ces résultats montrent que l'hydrolyse diminue considérablement la concentration en lipides des rejets et par conséquent des diètes. Ce qui réduit aussi, la quantité de lipases nécessaire pour digérer ces lipides. La sécrétion des enzymes est plus élevée pour les larves cultivées sur les diètes à base de rejet hydrolysé. Car ce traitement des rejets influence (réduit) aussi la viscosité et la taille des particules des diètes en rendant les nutriments bio disponibles pour les insectes qui les assimilent facilement.

4. Conclusion

La présente étude montre que les sécrétions des enzymes digestives des larves de *Cydia pomonella* élevées sur les diètes à base des eaux usées de micro-brasseries et des boues d'industrie de jus de pomme hydrolysées ou non permettent d'évaluer le bilan de nutrition des nutriments assimilés et de déterminer si l'hydrolyse favorise la consommation des diètes par les larves.

- a) La caractérisation de 2 types de rejets avant ou après hydrolyse a permis de choisir le rejet d'EMB comme agents nutritifs pour l'élevage du carpocapse de pomme (CP);
- b) L'hydrolyse ayant permis de réduire de plus de 50% la matière organique et la viscosité des rejets, à contribuer à la biodisponibilité des nutriments dans les rejets et surtout des diètes produites;
- c) Les tests d'élevage de *Cydia pomonella* ont fourni les meilleurs résultats d'éclosion d'œufs (93%), de croissance de Larves (85%), de chrysalides (76%) et de papillons (70%) pour la diète produite à partir de farine de soja (FS) et de rejet EMB hydrolysé à 100 °C pendant 30 min;
- d) Le bilan nutritionnel des larves élevées a permis de déterminer que la diète EMBH+FS a été plus assimilée (4 mg de diète, 1,571 mg protéines, 1,874 mg glucides et 0,374 mg lipides) que les autres diètes alternatives et la diète contrôle;
- e) L'activité enzymatique étudiée est plus élevée en utilisant la diète EMBH+FS;
- f) L'hydrolyse améliore la production du taux d'enzymes digestifs et surtout l'assimilation de la diète et des nutriments par les larves.

Remerciements

Les auteurs remercient sincèrement le Conseil de Recherche des Sciences Naturelles et d'ingénierie du Canada (Grants A4984, Canada Research chair), INRS-ETE et FQRNT (ENC) pour le support financier. Nous exprimons notre reconnaissance à BioTepp Inc. qui a fourni les œufs du Carpocapse de pomme (CP) utilisé pour les recherches expérimentales. Des remerciements sont aussi émis à l'endroit des industries la Barberie et Lassonde Inc. pour avoir fourni les échantillons de rejets d'eaux usées et de boues utilisés pour la réalisation des études. Les vues et les opinions exprimés dans cet article sont ceux des auteurs.

Liste des abréviations

EMB	Eaux usées de microbrasserie
EMB+FS	Extrait de levure et germe de blé substitués par les eaux usées de microbrasserie
EMB+POM	Germe de blé, farine de soja et extrait de levure substitués des eaux usées de microbrasserie et des boues d'industrie de jus de pomme
Contrôle	Diète contrôle de Biotepp Inc.
POM	Boues d'industrie de jus de pomme
POM + FS	Extrait de levure et germe de blé substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM + EL	Farine de soja et germe de blé substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM + GB	Farine de soja et extrait de levure substitués par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+FS+EL	Germe de blé substitué par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+GB+EL	Farine de soja substituée par les boues d'industrie de jus de pomme
POM+FS+GB	Extrait de levure substitué par les boues d'industrie de jus de pomme
FS	Farine de soja
ST	Solides totaux
GB	Germes de blé
% p/v	Poids par unité de volume
% p/p	Poids par unité de poids
EL	Extrait de levure

Références

- Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR & Surampalli RY (2007) Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochem.* 42 (9): 1302-1311.
- Alarcon FJ, Martinez TF, Barranco P, Cabello T, Diaz M & Moyano FJ (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 265-274
- APHA, AWWA & WEF (2005) Standard methods for the examination of water and Wastewater, 21st Edition.
- Aravinthan V, Mino T, Takizawa S, Satoh H & Matsuo T (2001) Sludge hydrolysate as a carbons source for denitrification. *Water Sci. Technol.* 43 (1): 191-199.
- Arijs Y & De-Clercq P (2004) Liver-based artificial diets for the production of *Orius laevigatus*. *BioControl* 49: 505-516.
- Bachelier G & Gavinelli R (1966). Cahier ORSTOM, série Pédologie, 4 (3).
- Barnabé S, Brar SK, Tyagi RD, Beauchesne I & Surampalli RY (2009) Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products - Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment* 407: 1471-1488.
- Barnes MM (1991) Codling Moth Occurrence, Host Race Formation, and Damage. In World Crop Pests: "Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control". *Elsevier* 5: 313-327.
- Batista A, Vetter W & Luckas B (2001) Use of focused open vessel microwave-assisted extraction as prelude for the determination of the fatty acid profile of fish R a comparison with results obtained after liquid-liquid extraction according to Bligh & Dyer. *European Food Research Technologies* 212: 377-384.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD & Valero JR (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41, 323-342.
- Brar SK, Verma M, Valero JR, Tyagi RD & Surampalli RY (2008) Wastewater sludges as novel growth substrates for rearing codling moth larvae. *World Journal Microbiology Biotechnology* 24: 2849-2857.
- Chapman RF (1998) The Insects: Structure and Function, 4th edition UK. Cambridge University Press 770 pp.
- Chu CP, Lin WW, Lee DJ, Chang BV & Peng XF (2002) Thermal treatment of waste activated sludge using liquid boiling. *Journal of Environ Engineering*: 1100-1103.
- Cohen AC (2001). Formalizing insect rearing and artificial diet technology. *Am. Entomol.* 47: 198-206.
- Cohen AC (2004). Insect diet-Science and Technology. *CRC Press, US*. 293 pp.

- Eskilsson CS & Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of chromatography* 902 (1): 227-50.
- Genc H (2006) General Principles of Insect Nutritional Ecology. *Trakya Univ J. Sci.* 7 (1): 53-57.
- Gnepe JR, Brar SK, Tyagi RD & Valero JR (2011) Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 46: 1–12.
- Hansen JD & Anderson PA (2006) Mass rearing codling moths: improvements and modifications. *Journal of Entomology Society of British Columbia* 103: 33-36.
- Johnson KS & Felton GW (2001) Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco. *Journal of Chemical Ecology* 27: 2579-2597.
- Lacey LA, Arthurs SP, Unruh TR, Headrick H & Fritts RJ (2006) Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment and post-application irrigation. *Biological Control, Elsevier* 37: 214-223.
- Lacey LA & Unruh TR (2007) Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*; lepidoptera: tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia* 12: 33-60.
- Lacey LA & Siegel JP (2000) Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application. *Kluwer Academic Publishers*: 253-273.
- Lacey LA & Arthurs SP (2005) New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 85-90.
- MENVIQ (1986). Sédiments-Détermination de l'azote et du carbone total, Analyse élémentaire (CHN) 86-09/305. Ministère de l'Environnement du Québec, Canada.
- MENVIQ (1989). Méthode de digestion des boues d'épuration 89.12/213-mét.1.-1. Ministère de l'Environnement du Québec, Canada.
- MENV (2007) Guide sur la valorisation des matières résiduelles fertilisantes. Critères de référence et normes réglementaires, Ministère de l'Environnement, Québec 127 p.
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem* 31: 426–428.
- Miron Y, Zéeman G, Van Lier JB & Lettinga G (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.
- Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107: 254-255.

- Moyano FJ, Diaz M, Alarcón FJ & Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Kugler Publications, Amsterdam/New York, *Fish Physiology and Biochemistry* 15 (2): 121-130.
- Nation JL (2001) Insect Physiology and Biochemistry. Boca Raton, Fla., CRC Press: 485 pp.
- Penaud V, Delgènes JP & Moletta R (1999). Thermo-chemical pretreatment of a microbial biomass: influence sodium hydroxide addition on solubilization and anaerobic biodegradability. *Enz. Microbial Technol.*, 25: 258-263.
- Pham TTH, Brar SK, Tyagi RD & Surampalli, RY (2010) Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrasonics Sonochemistry* 17: 38-45.
- Reuveny H & Cohen E (2007) Toxicity of azinphos-methyl to various development stages of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science* 63: 129–133.
- Salghi R (2008) Différentes Filières De Traitement Des Eaux. École Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir-ENSA, 31.
- Schieder D, Schneider R & F- Bischof (2000). Thermal hydrolysis (TDH) as a pretreatment method for the digestion of organic waste. *Water Sci. Technol.* 41 (3): 181-187.
- Shanableh A & Jomaa S (2001). Production and transformation of volatile fatty acids from sludge subjected to hydrothermal treatment. *Water Sci. Technol.*, 44 (10): 129-135.
- Toba H H & Howell J F (1991) An improved system for mass-rearing codling moths. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 88: 22-27.
- Stauffer C (1989) Enzyme assays for Food Scientists, Van Nostrand Reinhold/AVI, New York.
- Stamopoulos DC, Diamantidis G & Chloridis (1993) Activités enzymatiques du tube digestif du prédateur *Podisus maculiventris* (Hem.: Pentatomidae). *Entomophaga* 38 (4): 493-499.
- Vlyssides AG & Karlis PK (2004) Thermal-alkaline solubilisation of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 91: 201-206.
- Vu KD, Tyagi RD, Valero JR & Surampalli RY (2009) "Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater", *Bioprocess Biosyst Eng* vol. 32: 511–519.
- Wiggins JC (2004) Diet composition and method for rearing insects. N° PUB, US 2004/0228947 A1.
- Zouari N, & Jaoua S (1999) Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme Microb Technol* 25: 364–371.

Tableau 4.1: Paramètres physico-chimiques

Paramètres	EMB (g/L)	POM (g/L)
pH $\pm$ 0,1	4,45	3,3
ST	66,5 $\pm$ 6	45 $\pm$ 5
MES	26,5 $\pm$ 4	15,5 $\pm$ 2
Viscosité (mPa.s)	1335 $\pm$ 124	1101 $\pm$ 110
C _t	22,28 $\pm$ 3,5	14,04 $\pm$ 3
N _t	3,5 $\pm$ 1,1	3,18 $\pm$ 0,2
Protéine	16,9 $\pm$ 1,7	11,25 $\pm$ 1,3
Glucides	25,5 $\pm$ 2,6	22 $\pm$ 2,2
Lipides	0,25 $\pm$ 0,1	0,15 $\pm$ 0,2
Hydrolyse à 100 °C / 30 minutes		
pH $\pm$ 0,1	5,24	4,03
ST	59 $\pm$ 6	38 $\pm$ 4
MES	19 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1,1
Viscosité (mPa.s)	685 $\pm$ 71	602 $\pm$ 81
C _t	30,5 $\pm$ 3	28,69 $\pm$ 3
N _t	4,5 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,3
Protéines	20,8 $\pm$ 2	16,9 $\pm$ 1,2
Glucides	31,34 $\pm$ 3,1	27,41 $\pm$ 2,7
Lipides	0,127 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02

Tableau 4.2: Caractéristiques des diètes produites avec les rejets hydrolysés

Diètes	pH $\pm$ 0,1	RH (%)	Viscosité (mPa.s)	Glucides (mg)	Protéine (mg)	Lipides (mg)
Diète standard	5,09	40,2	142	4,2	3,71	2
EMB	5,2	35,8	770,5	3,2	2,7	1
EMB+FS	4,9	29,2	823	5,6	5,1	2,4
EMBH	4,96	25,9	435	22,4	18,9	7
EMB+FS				39,2	5,1	
POM	3,9	35,7	460	3	2,08	0,8
POM+FS	4,1	38,9	492	5	4,48	2,31
POMH	3,62	50,7	383	21	14,6	5,6
POMH+FS	4,55	32,4	392	35	31,4	16,2
POM+EMB	4,3	21	987	6,45	4,78	1,91

Erreurs standards sur la viscosité des diètes:

$\pm 11\%-18\%$

Erreurs standards sur la perte d'humidité (RH):

$\pm 10\% - 15\%$

Erreurs standards sur les nutriments (Protéines, glucides et lipides) :

$\pm 10\% - 12\%$

EMB: Diète à base d'eau usée de microbrasserie utilisée comme source de nutriments;

EMBH: Diète à base des EMB hydrolysé à 100°C/ 30 minutes;

EMB+FS: Diète à base des EMB et de la farine de soya comme source de nutriments

EMBH+FS: Diète à base des EMB hydrolysé à 100°C/30 minutes et de la FS;

POM: Diète à base de boue de jus de pomme utilisée comme source de nutriments;

POMH: Diète à base de POM hydrolysé à 100°C/ 30 minutes utilisée comme source de nutriments;

POM+FS: Diète à base de POM et de la farine de soya comme source de nutriments

POMH+FS: Diète à base de POM hydrolysé à 100°C/ 30 minutes et de la FS utilisée comme source de nutriments.

Tableau 4.3: Influences des diètes alternatives sur la croissance du carpocapse de pomme

Diètes	% Éclosions	% Larves	% Chrysalides	% Adultes
Diète standard	90	80	65	62
EMB	66	56	32	25
EMB-FS	79	76	37	32
EMBH	80	65	46	35
EMBH+FS	93	85	76	70
POM	52	43	22	14
POM-FS	68	66	28	19
POMH	62	55	40	35
POMH+FS	75	70	58	43
POM+EMB	51	48	27	22
POMH+EMBH	67	60	49	39

Tableau 4.4. Bilan de masse (mg) de la quantité de diète ingérée par les larves

Diètes	Masse totale	Masse Résiduelle	Masse consommée	Masse rejetée	Masse assimilée
Diète standard	8,1	3,5	4,6	1,1	3,5
EMB	9	6,3	2,7	1	1,7
EMB-FS	8,9	6	2,9	0,9	2
EMBH	8,5	4,9	3,6	1,2	2,4
EMBH-FS	8,7	3,1	5,6	1,6	4
POM	8,3	6	2,3	0,8	1,5
POM-FS	8,5	5,9	2,6	0,8	1,8
POMH	7,9	4,7	3,2	1	2,2
POMH+FS	7,9	3,9	4	1,4	2,6
POM+EMB	7,7	5,7	2	0,6	1,4
POMH+EMBH	7,8	5,1	2,7	0,7	2

Erreurs standards sur les masses de diètes : $\pm 10\%$ - 12%

Tableau 4.5: Bilan de masse des nutriments de la diète ingérée par les larves

Diètes	Totales (mg)			Résiduels (mg)			Consommés (mg)			Rejetés (mg)			Assimilés (mg)		
	G	P	L	G	P	L	G	P	L	G	P	L	G	P	L
Diète standard	0,68	0,6	0,3	0,336	0,297	0,16	0,386	0,341	0,184	0,093	0,082	0,044	0,294	0,26	0,14
EMB	0,576	0,486	0,18	0,403	0,340	0,126	0,173	0,146	0,054	0,064	0,054	0,02	0,109	0,092	0,034
EMB-FS	0,99	0,91	0,43	0,672	0,612	0,288	0,325	0,296	0,139	0,101	0,093	0,043	0,224	0,204	0,096
EMBH	2,808	2,013	0,59	2,195	1,852	0,686	1,613	1,361	0,504	0,538	0,454	0,168	1,075	0,907	0,336
EMBH+FS	3,821	3,212	0,923	1,293	0,999	0,411	2,528	2,213	0,512	0,654	0,642	0,138	1,874	1,571	0,374
POM	0,498	0,345	0,133	0,36	0,249	0,096	0,138	0,096	0,037	0,048	0,033	0,013	0,09	0,063	0,024
POM-FS	0,85	0,762	0,393	0,59	0,529	0,273	0,26	0,233	0,121	0,08	0,072	0,037	0,18	0,162	0,083
POMH	2,318	1,301	0,381	1,974	1,369	0,526	1,344	0,932	0,358	0,42	0,291	0,112	0,924	0,641	0,246
POMH+FS	2,93	2,35	0,55	1,03	0,841	0,174	1,9	1,509	0,374	0,38	0,278	0,129	1,52	1,231	0,245
POM+EMB	0,99	0,74	0,29	0,735	0,545	0,218	0,258	0,191	0,076	0,077	0,057	0,023	0,181	0,134	0,054
POMH+EMBH	3,84	3,12	0,81	1,49	1,31	0,49	2,35	1,81	0,42	0,844	0,47	0,19	1,506	1,34	0,24

Erreurs standards sur la quantité des nutriments présents dans la masse des diètes utilisées: $\pm 9\% - 11\%$

Tableau 4.6: Étude de l'activité enzymatique des larves de *Cydia pomonella*

Diètes	Larve	Masse (mg) / Taille (mm)	Amylases mg/L	Protéases UI/mL	Lipases U/mg enzy
Diète standard	20	27/2,7	2,6	53,7	2,03
EMB	13	20/2	1,3	22,4	0,45
EMB-FS	15	21/2,1	1,7	33,5	0,52
EMBH	17	22/2,3	2,1	35,3	0,64
EMBH+FS	23	24/2,4	2,9	58,2	0,87
POM	10	19/19	1	14,6	0,37
POM-FS	13	20/2	1,4	25,2	0,39
POMH	14	21/2,2	1,7	28,2	0,42
POMH+FS	18	23/2,3	2,2	42,3	0,96
POM+EMB	13	20/2,1	1,6	18,5	0,32
POMH+EMBH	16	22/2,3	2,1	29,7	0,36

Erreurs standards sur la quantité des larves : $\pm 11\% - 13\%$

Erreurs standards sur la masse et la taille des larves: $\pm 9\% - 12\%$

Erreurs standards sur la quantité des enzymes : $\pm 10\% - 15\%$

CHAPITRE V:
CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Conclusions

Les rejets agroindustriels (eaux usées de micro-brasseries, de boues d'industrie de jus de pommes et les eaux usées d'industries d'amidon) et les boues d'épuration municipales produites peuvent causer un problème de pollution de l'environnement, suite à une mauvaise gestion, du aux divers traitements (enfouissement, incinération ...) exorbitants.

À ce sujet, dans le souci de rentabiliser de façon utile et économique la réutilisation de ces rejets, les eaux usées de micro-brasseries (EMB) et les boues d'industrie de jus de pomme (POM) sont recyclés au cours des travaux de R&D de cette thèse comme produits à haute valeur ajoutée (PAV). En effet, ces rejets, compte tenu de leur potentiel nutritif élevé et de leurs propriétés physiques (Viscosité et taille de particules) sont utilisés comme source de nutriments pour la production des diètes utilisées pour l'élevage du *Cydia pomonella*.

La formulation finale de la diète à base de rejets prétraités (hydrolysés à différentes température, différents pH et à différents temps) à fourni les meilleurs résultats d'élevage de larves de CP à cause de l'augmentation de son potentiel nutritif et de la réduction de sa viscosité et de la taille de ses particules du à l'effet de l'hydrolyse sur les rejets. Par conséquent, ce projet visant à développer des stratégies et des méthodes de production de la diète à partir des rejets a eu des résultats positifs et mérite d'être poursuivi à grande échelle en vue d'aider les grandes compagnies comme Biotepp en vue de rentabiliser leur production de larves et de biopesticides (Baculovirus).

Pour atteindre ces objectifs, les relations entre le potentiel nutritif (C_t , NH_4^+ , N_t , N_{org} , Protéine, Glucide, lipides et minéraux) et les propriétés physiques (pH, ST, MES, viscosité et la taille des particules) des rejets agroindustrielles et les diètes alternatives produites ont été étudiées. Les relations entre les paramètres (taux d'éclosion, taux de croissance des larves, taux de croissance des chrysalides et taux croissance des papillons) d'élevage de *Cydia pomonella* élevé sur les diètes produites à partir des rejets ont été aussi étudiées.

Au Terme de cette thèse, six articles scientifiques ont été réalisés dont trois sont publiés.

Caractérisation et sélection des rejets pour l'élevage du carpocasse de pomme (CP)

1) La caractérisation des rejets agroindustriels (EMB, EUA et POM) et municipaux (BMS), a permis de choisir les rejets d'EMB et de POM comme les meilleurs (Potentiel nutritif plus élevé, faible concentration en métaux) devant être utilisé comme agents nutritifs pour l'élevage du CP.

Cette caractérisation a confirmé que les eaux usées de microbrasserie (EMB) sont plus riches en nutriments avec des concentrations plus élevées en ST, MES et en Rhéologie.

2) Un taux d'éclosions plus élevé (78.8%), un taux plus élevé de survie de larves (>50%) et d'adultes (33%) ont été obtenus par la diète à base d'EMB et de farine de sojas (FS).

3) La perte d'humidité est plus importante pour les diètes produites à partir du rejet ayant la plus faible concentration en solide totaux (4.4 g/L cas des EUA) et sans farine de sojas. La diète EUA+EL a fourni les résultats les plus faibles en taux éclosion, taux de croissance des larves et papillons.

4) Le pH des diètes produites est autour 5 et proche de celui de la diète standard (pH 6). Ceci favorise l'éclosion, la croissance des larves et la métamorphose des chrysalides.

5) Le bilan de masse nutritif montre que les larves de CP assimilent mieux les diètes à base d'EMB. Particulièrement la diète EMB-FS. Car le taux d'assimilation des nutriments par les larves est plus élevé sur cette diète. Les glucides et les protéines sont mieux assimilés que les lipides dans les diètes.

Propriétés physiques des diètes produites à base des EMB et de POM

Étude des propriétés physiques des diètes à base des EMB et POM utilisés comme substituts de certains ingrédients standards (Farine de soja, germe de blé et extrait de levure) a permis une corrélation possible entre la viscosité, la taille des particules des diètes et la croissance des larves.

- 1) La caractérisation des propriétés physiques agro-industriels a confirmé que la diète à base d'EMB à fournir une viscosité élevée (207 à 1899 mPa.s) et les tailles de particules les plus faibles, avec une concentration élevée (178.3 ± 16 à 206.92 ± 28 g/L) par rapport aux diètes à base POM et à la diète standard de Biotepp.
- 2) La diète EMB-FS a fourni d'excellents résultats d'élevage les résultats d'élevage les plus élevés (78.8 % éclosions, taux croissance de larves > 50 % et 33 % adultes). L'EMB et FS facilitent l'assimilation et la digestion de la diète par les larves;
- 3) La diminution de la viscosité apparente des diètes à base des EMB dans un court temps peut influencer la biodisponibilité des nutriments et réduire la croissance des larves.

L'optimisation des diètes à base des EMB et de POM et élevage de *Cydia pomonella*

Cette partie montre que le plan composite centré et la méthodologie des réponses de surface (MRS) sont des méthodes efficaces pour la détermination des conditions optimales pour la production des diètes afin d'améliorer le taux d'éclosions et le taux de croissance des larves du carpocapse de pomme (CP).

- 1) Le plan composite centré (PCC) a fourni suffisant d'informations pour l'optimisation afin de limiter le nombre d'expériences individuelles.
- 2) Durant la production des diètes, les rejets sélectionnés ont été utilisés pour remplacer certains ingrédients standards (FS, GB et EL) afin de maintenir la quantité de nutriments (Protéines, Glucides, lipides et minéraux) présents dans la diète standard.
- 3) Les expériences des tests multiples apportés en utilisant la MRS ont démontré que la diète EMB+FS a fourni les meilleurs résultats d'élevage de CP (75% éclosion, 62% larves, 42% adultes) par rapport à la diète standard (90% éclosion, 80 % larves, 70 % adultes) à cause de la

quantité des nutriments présents (5.6 g glucides, 5.1 g protéines et 2.4 lipides) et la viscosité (823 mPa.s) des diètes qui ont favorisé l'assimilation de ces diètes par les larves.

Prétraitement d'hydrolyse des rejets utilisés pour la production des diètes servant à l'élevage du carpocapse de pomme (CP)

Le présent travail montre que l'hydrolyse des eaux usées de micro-brasseries et des boues de jus de pomme permet d'augmenter le potentiel nutritif et de réduire la rhéologie des diètes à base de rejets afin d'optimiser l'élevage du carpocapse de pomme;

- 1) L'hydrolyse a permis de réduire de plus de 50% de matière organique et de plus de 200 % la rhéologie des rejets et surtout des diètes produites. Par contre le potentiel nutritif des rejets a été augmenté de plus de 50%;
- 2) L'hydrolyse des rejets s'améliore (réduction et lyse des floccs et des particules), avec l'augmentation du temps de traitement (30-45 min) et une température élevée (100-120 C);
- 3) Le traitement alcalin (pH 10) améliore le processus d'hydrolyse en réduisant (plus de 100%) la matière organique, la rhéologie; et en augmentant le potentiel nutritif des rejets;
- 4) Les tests de d'élevage de *Cydia pomonella* ont fourni les meilleurs résultats d'éclosion d'œufs (93%), de croissance de Larves (85%), de chrysalides (70%) et de papillons (64%) pour la diète produite à partir de farine de soja (FS) et du rejet EMB hydrolysé à 100 C, pendant 30 min et sans traitement de pH;

Activité enzymatique des larves du CP élevées sur les diètes à base d'EMB et de POM hydrolysée.

La présente étude montre que la sécrétion des enzymes digestives des larves de *Cydia pomonella* cultivées sur les diètes à base de rejets hydrolysés d'EMB et de POM a permis d'évaluer l'influence de l'hydrolyse sur le bilan de masse des nutriments assimilés par les larves;

- 1) La caractérisation de 2 types de rejets avant ou après hydrolyse, a permis de choisir le rejet d'EMB comme le meilleur agent nutritif pour la culture du CP;
- 2) L'hydrolyse a réduit de plus de 50% la matière organique et la viscosité des rejets. Cela a contribué à la biodisponibilité des nutriments dans les rejets et surtout dans les diètes produites;

- 3) Les tests d'élevage de *Cydia pomonella* ont fourni les meilleurs résultats de taux d'éclosion (93%), de croissance de Larves (85%), de croissances de chrysalides (70%) et de croissance des adultes (64%) sur la diète EMB+FS avec le rejet d'EMB hydrolysé à 100 °C, pendant 30 min et sans traitement de pH;
- 4) Le bilan de masse des nutriments détermine que la diète EMBH-100-30-FS a été plus assimilée par les larves que les autres diètes;
- 5) L'activité enzymatique des larves est plus élevée sur la diète EMBH-100-FS;
- 6) L'hydrolyse augmente la production du taux d'enzymes digestifs et surtout l'assimilation de la diète et des nutriments par les larves.

Les recherches effectuées dans le cadre de ce projet de doctorat a permis de créer une base solide de connaissance en vue de mettre sur pied un procédé industriel de production de diète basé sur des substrats nutritifs économiques et biodisponibles. Ce procédé peut s'adapter de façon spécifique à la production de biopesticides (baculovirus, Bt,...) et de diètes pour l'élevage des autres insectes. L'établissement de différentes techniques analytiques ajoutera une nouvelle dimension aux futures études pilotes pour la production de produits à valeur ajoutée en utilisant des eaux usées et des boues d'épuration comme substrat nutritif.

Recommandations

Les prochaines recherches sur la bioconversion des eaux usées et les boues d'épuration pourraient avantageusement tenir compte des recommandations suivantes:

- 1) Poursuivre cette étude en infectant, par le granulovirus *CpGV*, les larves durant leur élevage sur la diète EMB+FS et EMBH+FS afin de produire le baculovirus;
- 2) La formulation du baculovirus à partir des granules obtenues et des eaux usées de microbrasserie comme substrats nutritifs alternatifs doit être testée, afin de réduire le coût de ce bioinsecticide.
- 3) L'apport des rejets hydrolysés peut contribuer à augmenter la production des granules obtenues après infections des larves, en corrélation avec l'activité enzymatique des larves élevées sur ces diètes;
- 4) Des études pour déterminer la virulence du baculovirus vis-vis du carpocapse et des autres lépidoptères doivent être réalisées.
- 5) Des études sur les ingrédients du baculovirus et ceux des diètes doivent être conduites afin d'améliorer leur action contre les insectes ravageurs sans nuire à l'environnement.
- 6) Une étude technico économique de la meilleure diète EMB+FS doit être effectuée afin de déterminer le coût bénéfique et satisfaisant que peut rapporter l'utilisation de cette nouvelle diète alternative sur le marché international et les industries productrices de diètes par rapport au coût élevé de la diète standard.

ANNEXES

Annexe I

Données de l'article 1 du chapitre II :

**Agro-industrial waste as ingredient replacement for
codling moth diet**

Tableau 1: Perte d'humidité des diètes à base des eaux usées d'amidon-EUA (a); Eaux usées de micro-brasserie (b) et boue des industries de jus de pomme-POM (c) comme une fonction de temps; Moyenne $\pm$ Erreur de la méthode; Moyennes observées sont significativement différents (p -valeurs= p_{obs}) < $p(k-1, n-k)$); avec $k-1=9$; $n-k=20$, $n=3 \times k$, Test de Fisher).

Perte d'humidité - RH $\pm$ 0.5 (% v/p)										
Temps $\pm$ 1(J)	Contrôle	EUA/FS	EUA/EL	EUA/GB	EMB/FS	EMB/EL	EMB/GB	POM/FS	POM/EL	POM/GB
6	6	7.5	6	6.5	7	5	5.5	7	5.5	6
10	10	17	12	15	16	10.5	13	15	13	18
15	13.3	27	20	23	24.4	15	16.3	25	20	21
21	20	35	24	30	30	16.2	18.7	30	23.3	25.4
27	30.2	43	31	36	48	30.5	32	48	38	46
34	37	47	38	43	45	35	43	45	40	45
43	43	55	49	52	52	49	50	52	49	50

Tableau 2 : Bilan de masse de la quantité des diètes assimilées (a); La quantité de protéines assimilées (b); La quantité de glucides assimilés (c); La quantité des lipides assimilés (d) par les larves durant leur croissance. Moyennes observées sont significativement différents ($p\text{-valeurs}=p.\text{obs}$) < $p(k-1, n-k)$); avec $k-1=9; n-k=20, n=3xk$, Test de Fisher).

Nutriments	Contrôle	EUA/FS	EUA/EL	EUA/GB	EMB/FS	EMB/EL	EMB/GB	POM/FS	POM/EL	POM/GB
Mt (g)	9,8±0,1	10,1±1	9,4±0,06	12±0,08	10,6±0,08	9,9±0,6	12,54±0,4	9,8±0,1	11±0,09	10,4±0,1
Mr (g)	6,2 ±0,07	7± 0,08	5±0,03	8,2 ±0,06	7,2±0,09	5,1±1	8,7±0,6	5,2±0,08	5,5±0,07	5,2±0,06
Mc (g)	3,6±0,04	3,1±0,03	4,4±0,02	3,8±0,04	3,4±0,04	4,8±0,07	3,84±0,06	4,6±0,09	5,5±0,08	5,2±0,06
Me (g)	1,1±0,02	1,2±0,02	1,1±0,05	1,3±0,03	1,2±0,1	0,5±0,05	1,30±0,1	1,5±0,1	2,6±0,3	1,9±0,2
Ma (g)	2,5±0,2	1,9±0,2	3,3±0,3	2,5±0,3	2,2±0,2	3,3±0,3	2,54±0,3	3,1±0,3	3,9±0,4	3,3±0,3
Pt (g)	3,7±0,03	3,69±0,06	3,69±0,05	3,75±0,06	6.2	4.13	5.2±0,5	2,5±0,07	4,8±0,06	2,7±0,06
Pr (g)	2,34±0,04	2,56±0,07	1,96±0,06	2,56±0,07	4.2	2.13	3.6±0,4	1,33±0,04	2,4±0,07	1,4±0,05
Pc (g)	1,37±0,03	1,13±0,05	1,73±0,05	1,2±0,05	2	2	1.6±0,2	1,2±0,08	2,4±0,07	1,3±0,06
Pe (g)	0,42±0,012	0,44±0,03	0,43±0,03	0,41±0,02	0,7±0,07	0,62±0,06	0,54±0,05	0,4±0,03	0,7±0,04	0,5±0,04
Pa (g)	0,95±0,02	0,69±0,03	1,3±0,06	0,79±0,04	1,3±0,1	1,38±0,1	1,06±0,1	0,8±0,05	1,7±0,08	0,8±0,03
Gt (g)	4,12±0,04	5,31±0,07	4,5±0,05	5,4±0,04	4,12±0,4	4,2±0,4	4,16±0,4	2±0,06	4,3±0,06	3,8±0,07
Gr (g)	2,64±0,05	3,7±0,04	2,4±0,03	3,7±0,05	2,8±0,3	2,16±0,2	2,9±0,3	1,06±0,05	2,2±0,05	2±0,05
Gc (g)	1,48±0,05	1,61±0,2	2,1±0,8	1,66±0,04	1,32±0,1	2,04±0,2	1,26±0,1	0,94±0,04	2,1±0,04	1,8±0,06
Ge (g)	0,46±0,013	0,63±0,06	0,5±0,05	0,60±0,06	0,47±0,05	0,64±0,06	0,43±0,04	0,31±0,04	0,63±0,03	0,7±0,04
Ga (g)	1,02±0,04	0,98±0,04	1,6±0,06	1,06±0,05	0,85±0,08	1,4±0,1	0,83±0,08	0,63±0,05	1,5±0,06	1,1±0,05
Lt (g)	1.75	1.21	0.61	1.78	1.63±0,2	2.1±0,2	1.75±0,2	0,91±0,05	1,9±0,06	1,8±0,07
Lr (g)	1.11	0.84	0.32	1,22±	1.11±0,1	1.08±0,1	1.21±0,1	0,5±0,04	0,95±0,05	0,9±0,05
Lc (g)	0,64±0,03	0.37	0.29	0.56	0,52±0,05	1,02±0,1	0,54±0,05	0,41±0,03	0,95±0,05	0,9±0,05
Le (g)	0,203±0,01	0.14	0.07	0.089	0,18±0,02	0,32±0,03	0,18±0,02	0,14±0,03	0,3±0,03	0,33±0,02
La (g)	0,836±0,02	0.23	0.22	0.471	0,34±0,03	0,7±0,07	0,36±0,04	0,27±0,05	0,65±0,05	0,6±0,05

Tableau 3 : Taux d'éclosions des œufs, de croissance des larves et des adultes comme une fonction du temps d'élevage sur chaque diète: À base des eaux usées d'amidon (a); à base des eaux usées de micro-brasserie (b) à des boues d'industrie de jus de pomme (c). *Moyenne ± Erreur de la méthode; Moyennes observées sont significativement différents ($p\text{-valeurs}=p.\text{obs} < p(k-1,n-k)$); avec $k-1=9$; $n-k=20$, $n=3 \times k$, Test de Fisher).*

Temps (J)	Contrôle	EUA/FS	EUA/EL	EUA/GB	EMB/FS	EMB/EL	EMB/GB	POM/FS	POM/EL	POM/GB
6	74.04±7	57.7±6	70.8±7	65.4±6	60.7±6	78.6±8	68.8±7	57.6±6	63±6	62±6
27	55.6±6	34.6±3	49±5	42.8±4	36.4±4	50±5	43±4	36.4±4	48.1±5	46±5
34	37.14±4	30.5±3	42.3±4	31.03±3	32.2±3	48.1±5	42.8±4	30.62±3	47±5	38±4
43	28.6±3	11.8±1	16.7±2	6.7±0.7	16.7±2	33.33±3	22±2	8.33±0.8	16.7±2	11±1

Tableau 4 : Influence du pH des différentes diètes sur l'éclosion des œufs et la croissance des larves.

Diètes	pH $\pm$ 0,1
Contrôle	5.1
EUA/FS	4.94
EUA/EL	5.16
EUA/GB	5.47
EMB/FS	5.06
EMB/EL	5.07
EMB/GB	5.48
POM/FS	5.5
POM/EL	5.11
POM/GB	5.23

Annexe II

Données de l'article 2 du chapitre II:

Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides

Tableau 1 : Profil de la viscosité en fonction du temps des diètes produite à partir: (a) Eaux usées de micro-brasserie; et (b) les boues d'industrie de jus de pomme. Erreur standard de la méthode : 10 à 12%

La viscosité des diètes														
Temps (min)	Contrôle	EMB+EL	EMB+FS	EMB+GB	EMB+FS+EL	EMB+GB+EL	EMB+GB+FS	EMB+POM	POM+EL	POM+FS	POM+GB	POM+FS+EL	POM+GB+FS	POM+GB+EL
1	100	1689.4	1329.76	1609.74	1179.9	1459.76	1079.6	1799.36	1519.61	1349.92	1389.80	1119.65	1039.80	1189.71
5	90	1579.4	1259.77	1479.67	1099.9	1389.77	1009.6	1729.39	1329.65	1089.90	1129.85	929.80	789.85	999.84
10	80	1479.4	159.80	1399.64	1019.9	1289.77	929.59	1649.41	1139.67	959.83	1069.87	779.83	709.87	879.88
15	70	1419.4	1089.8	1339.67	959.94	1229.78	859.60	1549.43	1109.68	879.83	1009.86	659.86	589.90	759.89
20	60	1339.4	1029.8	1239.70	889.94	1139.80	719.60	1459.45	1079.69	819.85	959.85	599.87	549.90	699.90
25	50	1279.5	959.84	1189.72	779.94	1089.81	709.60	1389.47	1049.69	779.81	909.83	579.90	499.91	679.90
30	40	1219.5	909.85	1119.74	759.94	1049.82	679.60	1329.48	1019.70	749.85	889.84	559.90	479.91	659.91
35	30	1179.5	869.86	1059.75	739.95	979.82	619.60	1249.50	969.71	709.82	869.82	539.90	459.90	619.90
40	26	1119.5	829.87	1009.76	719.95	939.84	579.60	1189.51	929.72	689.85	829.86	529.88	449.91	599.92
45	23	1079.6	799.87	969.77	619.95	909.84	539.52	1149.52	919.72	679.81	799.88	509.89	439.93	579.93
50	20	1039.6	679.88	939.78	599.96	889.84	489.56	1119.50	879.74	659.82	759.88	479.90	429.93	559.94
55	16	1010	659.88	909.78	579.96	879.85	459.56	1089.51	859.75	649.84	739.85	449.90	419.94	529.94
60	14	989.66	639.88	889.79	559.96	819.85	449.57	1049.52	789.76	629.76	719.83	439.90	409.94	519.94

Tableau 2 : Profil de la contrainte de cisaillement (a) et de la viscosité (b) en fonction du taux de cisaillement des diètes produites à base des EMB

CONTRÔLE			EMB			EMB-EL			EMB-FS			EMB-GB			EMB-FS-EL			EMB-GB-EL			EMB-GB-FS		
Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat	Vis	S. St	S.Rat
99.96	0.11	0.37	1799.62	0.07	0.37	1899.53	0.09	0.37	1599.66	0.05	0.37	1739.95	0.06	0.37	1399.70	0.06	0.37	1599.66	0.07	0.37	1199.87	0.05	0.37
69.99	0.05	0.73	399.91	0.03	0.73	1499.68	0.15	0.73	1199.72	0.09	0.73	1399.55	0.10	0.73	1199.74	0.09	0.73	1199.74	0.09	0.73	999.89	0.07	0.73
47.99	0.05	1.83	199.96	0.04	1.83	1119.76	0.21	1.83	899.83	0.12	1.83	939.82	0.15	1.83	639.86	0.12	1.83	779.85	0.11	1.83	579.94	0.08	1.83
35.99	0.05	3.67	219.95	0.08	3.67	959.84	0.28	3.67	639.88	0.17	3.67	739.88	0.20	3.67	459.90	0.18	3.67	599.90	0.17	3.67	399.96	0.10	3.67
24.99	0.06	7.34	349.93	0.26	7.34	809.87	0.45	7.34	529.91	0.26	7.34	609.91	0.32	7.34	359.92	0.26	7.34	429.92	0.25	7.34	259.97	0.20	7.34
19.33	0.06	11.01	393.25	0.43	11.01	699.22	0.59	11.01	459.92	0.36	11.01	533.26	0.40	11.01	313.27	0.34	11.01	396.60	0.39	11.01	249.98	0.27	11.01
16.50	0.06	14.68	414.91	0.61	14.68	619.89	0.73	14.68	434.93	0.44	14.68	499.94	0.49	14.68	279.94	0.41	14.68	369.94	0.43	14.68	219.98	0.34	14.68
14.00	0.07	18.35	431.91	0.08	18.35	563.90	0.85	18.35	399.93	0.53	18.35	475.94	0.59	18.35	263.94	0.48	18.35	323.94	0.55	18.35	209.98	0.41	18.35
12.60	0.07	24.46	443.91	0.11	24.46	514.91	1.06	24.46	352.94	0.67	24.46	424.95	0.74	24.46	251.95	0.62	24.46	299.94	0.64	24.46	189.98	0.52	24.46
11.52	0.08	30.58	446.30	0.14	30.58	459.31	1.25	30.58	307.94	0.81	30.58	382.35	0.88	30.58	237.55	0.73	30.58	283.94	0.76	30.58	179.98	0.64	30.58
10.20	0.08	36.69	433.91	0.16	36.69	419.92	1.43	36.69	289.94	0.92	36.69	329.95	1.03	36.69	225.95	0.83	36.69	251.95	0.86	36.69	175.99	0.74	36.69
9.26	0.08	42.81	419.91	0.18	42.81	395.35	1.61	42.81	282.51	1.05	42.81	319.38	1.17	42.81	215.95	0.92	42.81	245.09	0.99	42.81	171.56	0.84	42.81
8.55	0.08	48.92	400.41	0.20	48.92	361.42	1.77	48.92	278.44	1.16	48.92	311.45	1.31	48.92	208.46	1.02	48.92	236.95	1.07	48.92	165.99	0.93	48.92
7.86	0.08	55.04	391.92	0.22	55.04	347.93	1.91	55.04	269.94	1.26	55.04	301.29	1.43	55.04	201.29	1.11	55.04	229.28	1.17	55.04	161.65	1.01	55.04
7.32	0.08	61.15	381.52	0.23	61.15	334.73	2.05	61.15	266.75	1.36	61.15	296.76	1.57	61.15	196.76	1.20	61.15	223.15	1.23	61.15	159.99	1.10	61.15
6.98	0.09	67.27	368.65	0.25	67.27	325.02	2.19	67.27	249.76	1.47	67.27	289.78	1.68	67.27	191.96	1.29	67.27	218.14	1.34	67.27	156.44	1.18	67.27
6.60	0.09	73.38	353.92	0.26	73.38	315.93	2.32	73.38	245.95	1.56	73.38	284.96	1.80	73.38	188.96	1.39	73.38	211.95	1.37	73.38	145.99	1.26	73.38
6.28	0.09	79.50	347.00	0.28	79.50	308.24	2.45	79.50	238.10	1.64	79.50	279.96	1.89	79.50	185.50	1.47	79.50	205.80	1.45	79.50	144.60	1.33	79.50
6.00	0.09	85.61	332.50	0.28	85.61	299.94	2.57	85.61	232.24	1.72	85.61	275.68	1.99	85.61	182.53	1.56	85.61	201.39	1.55	85.61	139.27	1.40	85.61
5.76	0.09	91.73	322.33	0.30	91.73	292.74	2.69	91.73	227.15	1.81	91.73	272.76	2.08	91.73	179.16	1.64	91.73	197.56	1.59	91.73	135.79	1.48	91.73
5.55	0.09	97.84	314.93	0.31	97.84	286.44	2.80	97.84	220.45	1.89	97.84	268.71	2.16	97.84	176.21	1.72	97.84	192.71	1.66	97.84	127.49	1.55	97.84
5.43	0.10	103.96	311.23	0.32	103.96	280.88	2.92	103.96	217.37	1.97	103.96	265.85	2.26	103.96	172.20	1.79	103.96	189.14	1.77	103.96	121.22	1.62	103.96
5.27	0.10	110.07	300.60	0.33	110.07	273.94	3.02	110.07	211.29	2.04	110.07	263.30	2.33	110.07	169.96	1.87	110.07	185.29	1.83	110.07	118.65	1.70	110.07
5.18	0.10	116.19	293.62	0.34	116.19	266.47	3.10	116.19	207.75	2.11	116.19	261.02	2.41	116.19	167.33	1.94	116.19	181.86	1.89	116.19	115.67	1.77	116.19
5.04	0.10	122.30	281.34	0.34	122.30	261.54	3.20	122.30	203.96	2.18	122.30	258.97	2.49	122.30	156.33	2.02	122.30	178.16	1.98	122.30	114.99	1.84	122.30
4.91	0.10	128.42	276.51	0.36	128.42	256.52	3.29	128.42	200.53	2.24	128.42	254.54	2.58	128.42	155.33	2.09	128.42	174.25	2.06	128.42	112.84	1.91	128.42
4.85	0.11	134.53	265.58	0.36	134.53	251.40	3.38	134.53	196.87	2.30	134.53	249.79	2.65	134.53	154.33	2.16	134.53	171.24	2.09	134.53	110.08	1.97	134.53
4.80	0.11	140.65	258.73	0.36	140.65	246.73	3.47	140.65	193.00	2.37	140.65	244.27	2.71	140.65	153.33	2.22	140.65	168.49	2.16	140.65	115.77	2.03	140.65
4.75	0.11	146.76	254.45	0.37	146.76	242.95	3.57	146.76	190.46	2.44	146.76	240.47	2.80	146.76	142.33	2.30	146.76	165.96	2.21	146.76	114.99	2.09	146.76
4.70	0.11	152.88	250.03	0.38	152.88	237.07	3.62	152.88	186.68	2.50	152.88	235.85	2.85	152.88	141.33	2.36	152.88	163.65	2.30	152.88	113.71	2.14	152.88
4.66	0.11	158.99	242.72	0.39	158.99	233.03	3.70	158.99	184.11	2.57	158.99	231.89	2.93	158.99	140.33	2.43	158.99	161.50	2.36	158.99	112.91	2.20	158.99
4.67	0.12	165.11	236.39	0.39	165.11	229.73	3.79	165.11	181.29	2.63	165.11	227.64	2.99	165.11	137.33	2.49	165.11	159.08	2.40	165.11	110.65	2.25	165.11
4.58	0.12	171.22	233.95	0.40	171.22	225.38	3.86	171.22	178.68	2.68	171.22	224.54	3.06	171.22	135.33	2.56	171.22	156.40	2.46	171.22	109.27	2.31	171.22
4.55	0.12	177.34	230.85	0.41	177.34	221.33	3.92	177.34	176.24	2.74	177.34	219.59	3.13	177.34	134.33	2.62	177.34	154.73	2.49	177.34	107.02	2.36	177.34
4.52	0.12	183.45	229.55	0.42	183.45	218.35	4.01	183.45	174.36	2.80	183.45	215.17	3.20	183.45	132.33	2.67	183.45	152.77	2.55	183.45	105.99	2.42	183.45
4.45	0.12	189.57	215.18	0.41	189.57	214.79	4.07	189.57	171.45	2.87	189.57	212.84	3.25	189.57	132.33	2.73	189.57	151.32	2.58	189.57	104.73	2.48	189.57
4.39	0.13	195.68	211.45	0.41	195.68	210.33	4.12	195.68	169.84	2.91	195.68	208.22	3.32	195.68	130.33	2.78	195.68	148.84	2.65	195.68	103.49	2.56	195.68
4.33	0.13	201.80	208.68	0.42	201.80	207.23	4.18	201.80	167.60	2.97	201.80	205.34	3.38	201.80	128.33	2.85	201.80	147.24	2.70	201.80	101.26	2.57	201.80

Tableau 2 (suite) : Contrainte de cisaillement (a) et de la viscosité (b) en fonction du taux de cisaillement des diètes produites à base des POM

POM			POM-WG			POM-YE			POM-SF			POM-WG-YE			POM-SF-YE			POM-SF-WG			POM-BWW		
Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat	Vis	S.St	S.Rat
2.00	0.00	0.37	1299.49	0.22	0.37	1329.70	0.25	0.37	1198.68	0.23	0.37	1098.63	0.21	0.37	998.76	0.03	0.37	899.79	0.04	0.37	2099.49	0.09	0.37
2.00	0.00	0.73	1199.55	0.29	0.73	1249.82	0.32	0.73	1089.15	0.27	0.73	959.30	0.26	0.73	899.23	0.22	0.73	699.81	0.07	0.73	1999.55	0.15	0.73
1.20	0.00	1.83	1039.78	0.32	1.83	1129.63	0.35	1.83	879.68	0.29	1.83	619.63	0.33	1.83	799.62	0.20	1.83	519.86	0.12	1.83	1719.63	0.32	1.83
1.00	0.00	3.67	839.80	0.36	3.67	989.77	0.40	3.67	679.85	0.34	3.67	239.50	0.34	3.67	619.80	0.27	3.67	359.90	0.18	3.67	1339.71	0.49	3.67
0.80	0.01	7.34	629.89	0.43	7.34	669.86	0.48	7.34	419.91	0.39	7.34	179.75	0.40	7.34	339.88	0.34	7.34	319.93	0.26	7.34	1039.78	0.76	7.34
0.73	0.01	11.01	513.25	0.49	11.01	573.23	0.54	11.01	259.94	0.45	11.01	163.17	0.41	11.01	273.25	0.43	11.01	259.94	0.31	11.01	879.81	0.97	11.01
0.70	0.01	14.68	304.93	0.52	14.68	379.92	0.58	14.68	204.96	0.45	14.68	157.90	0.45	14.68	204.93	0.48	14.68	239.95	0.35	14.68	784.83	1.15	14.68
0.68	0.01	18.35	289.95	0.53	18.35	361.92	0.65	18.35	179.96	0.46	18.35	137.93	0.45	18.35	191.96	0.56	18.35	203.96	0.37	18.35	719.85	1.32	18.35
0.54	0.01	24.46	279.95	0.61	24.46	316.94	0.73	24.46	146.97	0.56	24.46	116.95	0.49	24.46	163.97	0.58	24.46	179.96	0.44	24.46	632.86	1.55	24.46
0.50	0.02	30.58	204.36	0.69	30.58	271.54	0.80	30.58	127.17	0.59	30.58	99.16	0.54	30.58	147.95	0.59	30.58	163.17	0.50	30.58	575.88	1.76	30.58
0.46	0.02	36.69	195.96	0.75	36.69	247.95	0.87	36.69	127.97	0.61	36.69	98.97	0.56	36.69	145.68	0.60	36.69	153.97	0.56	36.69	531.89	1.95	36.69
0.43	0.02	42.81	185.97	0.81	42.81	227.67	0.93	42.81	121.69	0.67	42.81	96.26	0.61	42.81	134.97	0.62	42.81	140.54	0.60	42.81	498.75	2.13	42.81
0.39	0.02	48.92	172.97	0.86	48.92	219.46	0.98	48.92	115.48	0.75	48.92	95.97	0.65	48.92	119.97	0.66	48.92	131.97	0.65	48.92	467.90	2.29	48.92
0.39	0.02	55.04	175.97	0.88	55.04	197.96	1.03	55.04	113.31	0.76	55.04	93.64	0.67	55.04	111.58	0.66	55.04	126.64	0.70	55.04	442.57	2.44	55.04
0.37	0.02	61.15	157.17	0.92	61.15	188.76	1.09	61.15	110.38	0.78	61.15	92.18	0.70	61.15	102.52	0.68	61.15	116.38	0.71	61.15	418.71	2.56	61.15
0.35	0.02	67.27	125.43	0.96	67.27	180.15	1.14	67.27	104.70	0.84	67.27	91.16	0.74	67.27	101.98	0.69	67.27	113.43	0.76	67.27	397.01	2.67	67.27
0.33	0.02	73.38	121.97	1.00	73.38	172.97	1.20	73.38	100.98	0.90	73.38	90.98	0.76	73.38	100.96	0.75	73.38	110.98	0.81	73.38	378.92	2.78	73.38
0.30	0.02	79.50	116.28	1.03	79.50	165.04	1.23	79.50	98.75	0.92	79.50	86.90	0.77	79.50	96.90	0.77	79.50	104.29	0.83	79.50	370.69	2.88	79.50
0.31	0.03	85.61	116.55	1.06	85.61	156.54	1.25	85.61	96.84	1.00	85.61	83.41	0.80	85.61	92.55	0.79	85.61	102.84	0.88	85.61	358.78	2.99	85.61
0.30	0.03	91.73	110.38	1.14	91.73	154.54	1.28	91.73	92.78	1.01	91.73	81.18	0.84	91.73	95.98	0.88	91.73	79.18	0.91	91.73	347.53	3.10	91.73
0.28	0.03	97.84	104.23	1.12	97.84	152.54	1.28	97.84	89.98	1.02	97.84	80.98	0.85	97.84	96.73	0.95	97.84	70.73	0.92	97.84	336.93	3.20	97.84
0.28	0.03	103.96	100.92	1.15	103.96	151.54	1.35	103.96	88.22	1.05	103.96	78.10	0.90	103.96	93.86	0.98	103.96	67.63	0.93	103.96	326.17	3.29	103.96
0.26	0.03	110.07	97.98	1.17	110.07	150.54	1.39	110.07	86.65	1.08	110.07	77.32	0.92	110.07	91.31	1.01	110.07	65.98	0.95	110.07	315.93	3.37	110.07
0.25	0.03	116.19	95.43	1.21	116.19	149.97	1.39	116.19	85.88	1.10	116.19	75.46	0.95	116.19	88.40	1.03	116.19	62.61	0.98	116.19	306.78	3.45	116.19
0.23	0.03	122.30	94.72	1.25	122.30	147.97	1.42	122.30	84.58	1.11	122.30	74.98	0.99	122.30	84.58	1.03	122.30	60.78	1.01	122.30	297.94	3.52	122.30
0.22	0.03	128.42	90.58	1.29	128.42	145.97	1.47	128.42	84.53	1.15	128.42	71.13	1.04	128.42	81.13	1.04	128.42	59.98	1.03	128.42	291.65	3.62	128.42
0.21	0.03	134.53	89.70	1.34	134.53	141.22	1.49	134.53	82.84	1.28	134.53	69.07	1.06	134.53	80.71	1.09	134.53	58.98	1.05	134.53	284.31	3.69	134.53
0.21	0.03	140.65	88.48	1.38	140.65	139.85	1.52	140.65	81.48	1.30	140.65	67.81	1.12	140.65	77.72	1.09	140.65	57.16	1.07	140.65	278.12	3.77	140.65
0.19	0.03	146.76	87.11	1.41	146.76	135.97	1.52	146.76	80.75	1.30	146.76	66.98	1.16	146.76	76.48	1.12	146.76	56.48	1.06	146.76	272.94	3.86	146.76
0.19	0.03	152.88	84.90	1.47	152.88	129.34	1.57	152.88	80.62	1.29	152.88	65.22	1.20	152.88	75.82	1.16	152.88	54.42	1.12	152.88	267.71	3.94	152.88
0.18	0.03	158.99	84.46	1.49	158.99	125.78	1.61	158.99	80.23	1.35	158.99	64.60	1.22	158.99	76.14	1.21	158.99	53.60	1.12	158.99	263.33	4.03	158.99
0.18	0.03	165.11	84.43	1.54	165.11	124.26	1.64	165.11	79.98	1.39	165.11	62.87	1.27	165.11	75.54	1.25	165.11	52.65	1.17	165.11	258.84	4.11	165.11
0.17	0.03	171.22	83.15	1.59	171.22	123.70	1.69	171.22	79.85	1.40	171.22	60.41	1.29	171.22	75.84	1.30	171.22	50.27	1.15	171.22	255.52	4.20	171.22
0.16	0.03	177.34	81.84	1.62	177.34	121.98	1.72	177.34	79.72	1.47	177.34	58.64	1.31	177.34	75.29	1.34	177.34	49.43	1.20	177.34	253.26	4.31	177.34

Tableau 2 (suite) : Contrainte de cisaillement (a) et de la viscosité (b) en fonction du taux de cisaillement des diètes produites à base des POM

POM			POM-WG			POM-YE			POM-SF			POM-WG-YE			POM-SF-YE			POM-SF-WG			POM-BWW		
0.16	0.03	183.45	81.58	1.65	183.45	118.48	1.75	183.45	79.29	1.50	183.45	56.58	1.35	183.45	73.58	1.35	183.45	48.39	1.22	183.45	250.75	4.42	183.45
0.15	0.03	189.57	78.56	1.69	189.57	115.70	1.79	189.57	78.89	1.49	189.57	55.15	1.39	189.57	73.92	1.40	189.57	47.79	1.25	189.57	247.63	4.50	189.57
0.15	0.03	195.68	78.36	1.73	195.68	111.52	1.83	195.68	78.38	1.53	195.68	53.61	1.40	195.68	73.86	1.45	195.68	46.36	1.30	195.68	245.07	4.60	195.68
0.14	0.03	201.80	75.62	1.76	201.80	109.53	1.86	201.80	77.55	1.53	201.80	50.98	1.45	201.80	71.26	1.44	201.80	45.44	1.32	201.80	242.31	4.69	201.80

Tableau 3a : Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%.

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	EMB+POM	EMB	EMB+EL	EMB+GB	EMB+FS	POM+FS+GB	EMB+GB+EL	POM+FS+EL
0.04	0	0	0	0	0	4.54E-05	0	9.25E-05
0.0439105	0	0	0	0	0	6.09E-05	0	0.00012489
0.0482033	0	0	0	0	0	9.97E-05	0	0.00020545
0.0529158	0	0	0	0	0	0.00020054	0	0.00041329
0.0580889	0	0	0	0	0	0.0004158	0	0.00085534
0.0637679	0	0	0	0	0	0.00077621	0	0.00159592
0.070002	0	0	0	0	0	0.00121905	0	0.00250946
0.0768455	0	0	0	0	0	0.00167632	0	0.00345212
0.0843581	0	0	0	0	0	0.00215423	0	0.00442754
0.0926052	0	0	0	0	0	0.00270055	0	0.00553419
0.101658	0	0	0	0	0	0.00331707	0	0.00677607
0.111597	0	0	0	0	0	0.00396183	0	0.00807195
0.122507	0	0	0	0	0	0.00463351	0	0.00941093
0.134483	0	0	0	0	0	0.00535931	0	0.0108524
0.147631	0	0	0	0	0	0.00616527	0	0.01245
0.162064	0	0	0	0	0	0.0070574	0	0.0142253
0.177907	0	0	0	0	0	0.00805019	0	0.0162156
0.1953	0	0	0	0	0	0.00917809	0	0.0184961
0.214393	0	0	0	0	0	0.0104896	0	0.0211827
0.235353	0	0	0	0	0	0.0120009	0	0.0243472
0.258361	0	0	0	0	0	0.0136954	0	0.0280076
0.283619	0	0	0	0	0	0.015547	0	0.0321205
0.311346	0	0	0	0	0	0.0175502	0	0.0366489
0.341784	0	0	0	0	0	0.0197325	0	0.0416063
0.375198	0	0	0	0	0	0.0221315	0	0.0470231
0.411878	0	0	0	0	0	0.0247946	0	0.0528684
0.452145	0	0	0	0	0	0.0277489	0	0.0589552

Tableau 3a (Suite) : Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	EMB+POM	EMB	EMB+EL	EMB+GB	EMB+FS	POM+FS+GB	EMB+GB+EL	POM+FS+EL
0.496347	0	0	0	0	0	0.0310047	0	0.0649279
0.544872	0	0	0	0	0	0.0345352	0	0.0703127
0.59814	0	0	0	0	0	0.0383067	0	0.0746444
0.656615	0	0	0	0	0	0.0422639	0	0.0774847
0.720807	0	0	0	0	0	0.0463555	0	0.0784527
0.791275	0	0	0	0	0	0.0504929	0	0.0771244
0.868632	0	0	0	0	0	0.0545826	0	0.0731853
0.953552	0	0	0	0	0	0.0585596	0	0.0666117
1.04677	0	0	0	0	0	0.0624408	0	0.0578517
1.14911	0	0	0	0	0	0.0663679	0	0.0479174
1.26145	0	0	0	0	0	0.0705922	0	0.0385027
1.38477	0	0	0	0	0	0.075542	0	0.0317954
1.52015	0	0	0	0	6.08E-05	0.0817781	0	0.0299519
1.66876	0.000684	0	0	0	0.00121	0.0900499	0	0.0351452
1.8319	0.009283	0.0014	0.00048	0.000988	0.00839	0.1012	0.0005668	0.0504096
2.011	0.051524	0.021	0.00982	0.014083	0.0302	0.116166	0.0097061	0.0798435
2.2076	0.145804	0.119	0.06645	0.08003	0.07305	0.13585	0.0605621	0.127564
2.42342	0.293565	0.354	0.22935	0.232443	0.1378	0.161084	0.193844	0.196812
2.66033	0.477231	0.728	0.51706	0.472861	0.22453	0.192531	0.419234	0.289582
2.92042	0.70459	1.189	0.89852	0.768367	0.3342	0.230552	0.711637	0.406546
3.20592	0.976697	1.727	1.34302	1.11806	0.465892	0.275091	1.05857	0.546652
3.51934	1.28866	2.3311	1.84528	1.51901	0.61751	0.325555	1.45858	0.707229
3.8634	1.62883	2.9859	2.39433	1.9594	0.78459	0.380885	1.90186	0.883723
4.2411	1.98047	3.6619	2.96708	2.42007	0.96026	0.439552	2.37021	1.06973
4.65572	2.32595	4.3152	3.53038	2.87294	1.13579	0.499722	2.83677	1.25702
0.411878	0	0	0	0	0	0.0247946	0	0.0528684
0.452145	0	0	0	0	0	0.0277489	0	0.0589552

Tableau 3a (Suite) : Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	EMB+POM	EMB	EMB+EL	EMB+GB	EMB+FS	POM+FS+GB	EMB+GB+EL	POM+FS+EL
5.11087	2.64669	4.9026	4.04246	3.29185	1.30199	0.559258	3.27185	1.43632
5.61052	2.92507	5.3952	4.47854	3.65661	1.45028	0.615986	3.65455	1.59854
6.15902	3.14257	5.7702	4.81832	3.95033	1.57234	0.667898	3.96679	1.73533
6.76114	3.28292	6.0015	5.04438	4.15509	1.6607	0.713299	4.19158	1.83935
7.42212	3.32978	6.0586	5.12811	4.24983	1.70756	0.750628	4.30582	1.90294
8.14773	3.26663	5.9087	5.0421	4.21509	1.70492	0.777937	4.28787	1.91768
8.94427	3.07976	5.5303	4.76707	4.03616	1.64627	0.793289	4.12115	1.87605
9.81869	2.76539	4.9215	4.30083	3.71106	1.52971	0.795275	3.80221	1.77502
10.7786	2.34147	4.1112	3.66978	3.25892	1.36319	0.785076	3.3498	1.62168
11.8323	1.85036	3.1632	2.92697	2.72431	1.16606	0.766823	2.80724	1.43466
12.9891	1.35631	2.1748	2.15597	2.17491	0.967489	0.747305	2.24242	1.242
14.2589	0.933861	1.2684	1.46127	1.68989	0.799492	0.733956	1.73572	1.07475
15.6529	0.644561	0.6084	0.950729	1.33961	0.688218	0.733262	1.36167	0.959995
17.1832	0.512198	0.2863	0.681922	1.16536	0.648782	0.750285	1.16585	0.916429
18.863	0.529787	0.2353	0.651574	1.17706	0.684592	0.787726	1.16088	0.951826
20.7071	0.682932	0.4164	0.84362	1.3598	0.788592	0.84567	1.33444	1.06183
22.7315	0.936801	0.8362	1.22313	1.66585	0.939736	0.919431	1.64207	1.22544
24.9538	1.21644	1.3829	1.68211	2.00459	1.1033	0.999162	1.9954	1.40399
27.3934	1.431	1.8208	2.05395	2.26426	1.23937	1.07078	2.27988	1.54931
30.0714	1.51961	2.0097	2.20818	2.3597	1.31743	1.12031	2.40398	1.62161
33.0113	1.47457	1.9176	2.10731	2.26861	1.32704	1.13941	2.33798	1.60594
36.2385	1.33732	1.6202	1.81516	2.03614	1.27894	1.12819	2.12175	1.51691
39.7813	1.17481	1.2579	1.46056	1.74884	1.19798	1.09491	1.84046	1.39015
43.6704	1.04573	0.9605	1.16668	1.49061	1.1106	1.05128	1.57969	1.26379
47.9397	0.979775	0.7899	0.997492	1.31024	1.03549	1.00783	1.39078	1.16314

Tableau 3a (Suite). Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	EMB+POM	EMB	EMB+EL	EMB+GB	EMB+FS	POM+FS+GB	EMB+GB+EL	POM+FS+EL
52.6264	0.975305	0.74155	0.95107	1.21358	0.9804	0.97123	1.2808	1.0949
57.7713	1.00959	0.77171	0.98107	1.176	0.9448	0.944204	1.22441	1.05148
63.4192	1.05529	0.824794	1.02328	1.16312	0.925586	0.92798	1.18659	1.02177
69.6192	1.09524	0.854885	1.02401	1.14729	0.92056	0.923677	1.14149	0.999733
76.4253	1.13029	0.847592	0.969557	1.11833	0.928328	0.932414	1.08368	0.987513
83.8969	1.17067	0.811841	0.881599	1.07799	0.944801	0.953346	1.02041	0.989505
92.0988	1.22356	0.759526	0.790973	1.03094	0.961463	0.98262	0.958701	1.00481
101.103	1.28886	0.696563	0.717635	0.98286	0.97119	1.01739	0.902096	1.02742
110.987	1.36522	0.62897	0.668696	0.94519	0.977522	1.06215	0.857013	1.05433
121.837	1.46169	0.572826	0.650426	0.94051	1.00048	1.13276	0.841699	1.09622
133.748	1.59415	0.5486	0.672012	0.99197	1.06585	1.24798	0.878178	1.17321
146.824	1.76907	0.56777	0.740059	1.10719	1.18637	1.41331	0.975425	1.29802
161.177	1.95876	0.619802	0.841612	1.25738	1.34184	1.60252	1.10743	1.45273
176.935	2.09393	0.672083	0.931512	1.37204	1.47435	1.75542	1.20486	1.58062
194.232	2.08841	0.685055	0.942287	1.36524	1.51239	1.80252	1.18155	1.6064
213.221	1.89419	0.640535	0.823067	1.18824	1.41932	1.71186	0.990808	1.4874
234.066	1.55041	0.554158	0.586249	0.87591	1.23023	1.52248	0.675794	1.25771
256.948	1.18	0.453763	0.33303	0.54955	1.03929	1.33086	0.379979	1.02126
282.068	0.916807	0.359385	0.178907	0.33680	0.942045	1.23709	0.220346	0.88636
309.644	0.830438	0.272543	0.150026	0.2771	0.993478	1.30136	0.214383	0.914084
339.916	0.924533	0.186987	0.247089	0.36247	1.20233	1.53348	0.359729	1.1167
373.147	1.15219	0.10133	0.468669	0.56749	1.52711	1.88833	0.638714	1.45821
409.626	1.41033	0.0372414	0.745007	0.80959	1.87704	2.27218	0.940194	1.84359

Tableau 3a (suite) : Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des eaux usées de micro-brasserie. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	EMB+PO M	EMB	EMB+EL	EMB+GB	EMB+FS	POM+FS+G B	EMB+GB+E L	POM+FS+ EL
449.672	1.57608	0.006868	0.940872	0.956163	2.15545	2.58679	1.11435	2.16422
493.633	1.58127	0.000478	0.989562	0.933412	2.31301	2.78187	1.10174	2.35325
541.892	1.44853	0	0.894931	0.750997	2.37332	2.87973	0.926784	2.41537
594.869	1.26769	0	0.707829	0.46896	2.39823	2.94209	0.667854	2.41875
653.025	1.12618	0	0.435352	0.208884	2.45157	3.03212	0.372797	2.43637
716.866	1.07228	0	0.189868	0.0546542	2.55397	3.16837	0.147414	2.52379
786.949	1.12244	0	0.040138	0.0069759	2.68772	3.32155	0.0289643	2.72166
863.883	1.22342	0	0.003647	0.000201	2.80559	3.43317	0.0024307	2.949
948.338	1.31127	0	0	0	2.86074	3.444	0	3.10061
1041.05	1.28045	0	0	0	2.82436	3.32614	0	2.96857
1142.83	0.94909	0	0	0	2.72528	3.11095	0	2.16724
1254.55	0.48626	0	0	0	2.5652	2.80772	0	1.09377
1377.2	0.11455	0	0	0	2.3577	2.44008	0	0.255096
1511.84	0.01195	0	0	0	2.08131	2.00627	0	0.026168
1659.64	0	0	0	0	1.84147	1.65676	0	0
1821.89	0	0	0	0	1.63473	1.35844	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 3b : Volume de distribution de la fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des boues d'industrie de pomme. Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	Contrôle	POM	POM+EL	POM+GB	POM+FS	POM+FS+GB	POM+GB+EL	POM+FS+EL
0.04	0.000236	0	0	0	4.82E-05	5.07E-05	0	8.16E-05
0.0439105	0.000307	0	0	0	6.15E-05	6.45E-05	1.54E-08	0.0001059
0.0482033	0.000493	0	0	0	9.55E-05	9.99E-05	2.83E-07	0.0001676
0.0529158	0.000967	0	0	0	0.000188	0.000198	1.47E-06	0.0003337
0.0580889	0.00202	0	0	0	0.000396	0.00041594	3.69E-06	0.0006968
0.0637679	0.003903	0	0	1.99E-07	0.000741	0.00077628	9.69E-06	0.0012996
0.070002	0.006544	0	0	5.90E-06	0.001137	0.00118119	3.58E-05	0.0019973
0.0768455	0.009546	0	2.11E-06	5.45E-05	0.001495	0.00153584	0.00014014	0.0026394
0.0843581	0.012895	0	4.02E-05	0.000251	0.001815	0.00184741	0.00041732	0.0032278
0.0926052	0.016788	8.04E-07	0.000274	0.000724	0.002135	0.0021521	0.00093458	0.0038292
0.101658	0.021392	2.03E-05	0.000951	0.001525	0.002446	0.0024376	0.00168603	0.0044259
0.111597	0.026429	0.000172	0.002195	0.002619	0.002709	0.0026675	0.00265303	0.0049452
0.122507	0.031667	0.000723	0.003909	0.003981	0.002931	0.0028557	0.00382605	0.0053885
0.134483	0.037106	0.001944	0.006058	0.005618	0.003125	0.0030095	0.00519984	0.0057836
0.147631	0.042818	0.003846	0.008678	0.007530	0.003287	0.003126	0.00677124	0.0061344
0.162064	0.048751	0.006328	0.011777	0.009687	0.003421	0.0032124	0.00852666	0.0064271
0.177907	0.054706	0.009321	0.015278	0.012032	0.003539	0.0032906	0.0104366	0.0066584
0.1953	0.060416	0.012839	0.01906	0.014494	0.003664	0.0033871	0.0124467	0.0068505
0.214393	0.065623	0.016782	0.022965	0.016977	0.003813	0.0035219	0.0144962	0.0070163
0.235353	0.069827	0.020815	0.026670	0.019276	0.004013	0.0037338	0.016444	0.0071626
0.258361	0.072519	0.024392	0.029738	0.021148	0.004298	0.0040607	0.0181292	0.0073004
0.283619	0.073288	0.02698	0.031729	0.022354	0.004719	0.0045587	0.0193745	0.0074841
0.311346	0.072324	0.028335	0.032516	0.022861	0.005322	0.0052721	0.0201662	0.0077738
0.341784	0.069959	0.028485	0.032179	0.022725	0.006167	0.0062716	0.020552	0.0082379
0.375198	0.066808	0.027623	0.031001	0.022158	0.007332	0.0076220	0.0207101	0.0089475
0.411878	0.063209	0.025967	0.029195	0.021325	0.008916	0.009422	0.020788	0.0100017

Tableau 3b (Suite) : Volume de distribution de fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base des boues d'industrie de jus de pomme (b). Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	Contrôle	POM	POM+EL	POM+GB	POM+FS	POM+FS+GB	POM+GB+EL	POM+FS+EL
0.452145	0.05971	0.02385	0.02710	0.02049	0.01100	0.0117425	0.0210203	0.0115018
0.496347	0.05669	0.02161	0.02505	0.01990	0.01367	0.0146826	0.0216291	0.0135543
0.544872	0.05473	0.01969	0.02348	0.01989	0.01701	0.0183138	0.0228931	0.0162539
0.59814	0.05428	0.01842	0.02276	0.02074	0.02110	0.0227133	0.025062	0.0196807
0.656615	0.05598	0.01809	0.02324	0.02275	0.02599	0.0279139	0.0283857	0.023885
0.720807	0.06045	0.01897	0.02525	0.02618	0.03169	0.0339467	0.0331131	0.0289005
0.791275	0.06849	0.02133	0.02912	0.03131	0.03821	0.0408254	0.0394796	0.0347408
0.868632	0.08099	0.02549	0.03528	0.03847	0.04552	0.0485327	0.0477553	0.0413707
0.953552	0.09889	0.03178	0.04417	0.048008	0.05357	0.0570029	0.0581716	0.0486987
1.04677	0.12314	0.040436	0.05614	0.06016	0.062236	0.0661172	0.0709615	0.0565789
1.14911	0.15440	0.051453	0.07122	0.074944	0.071341	0.0757509	0.0862011	0.0648474
1.26145	0.19321	0.064707	0.08932	0.09223	0.080697	0.0857307	0.103837	0.0733067
1.38477	0.2398	0.07995	0.11018	0.11177	0.090146	0.0959064	0.123713	0.0817831
1.52015	0.29438	0.096959	0.13359	0.13336	0.09955	0.106113	0.145673	0.0901161
1.66876	0.35721	0.11552	0.15926	0.156751	0.10882	0.116307	0.169695	0.0982568
1.8319	0.42857	0.13539	0.18687	0.181632	0.11793	0.126478	0.195689	0.106211
2.011	0.50865	0.15631	0.21602	0.207646	0.12688	0.136666	0.223489	0.114044
2.2076	0.59726	0.17789	0.24622	0.234374	0.13572	0.146864	0.252683	0.121806
2.42342	0.69397	0.19979	0.27692	0.261357	0.14446	0.157083	0.282857	0.129577
2.66033	0.79822	0.22165	0.30758	0.288152	0.15322	0.167432	0.313632	0.137522
2.92042	0.90947	0.24307	0.33757	0.314278	0.16208	0.17806	0.344581	0.145847
3.20592	1.02703	0.26363	0.36629	0.339326	0.17120	0.189151	0.375139	0.154776
3.51934	1.14979	0.28299	0.39311	0.36285	0.18063	0.200731	0.404518	0.164386
3.8634	1.27637	0.30045	0.41744	0.384499	0.19041	0.212893	0.432155	0.174773
4.2411	1.4055	0.31594	0.43876	0.404006	0.20060	0.2258	0.457784	0.186047
4.65572	1.53642	0.32918	0.45674	0.421325	0.21133	0.239839	0.481602	0.198463

Tableau 3b (Suite) : Volume de distribution de fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base de boues d'industrie de jus de pomme (b). Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	Contrôle	POM	POM+EL	POM+GB	POM+FS	POM+FS+GB	POM+GB+EL	POM+FS+EL
5.11087	1.66851	0.340105	0.471222	0.436574	0.222708	0.255359	0.503816	0.212202
5.61052	1.80077	0.348662	0.482123	0.449919	0.234782	0.27258	0.524731	0.227291
6.15902	1.93191	0.354918	0.489545	0.461681	0.247583	0.291726	0.545018	0.243721
6.76114	2.06078	0.358968	0.493488	0.472098	0.261096	0.31312	0.5658	0.261549
7.42212	2.18654	0.361017	0.494149	0.481699	0.275507	0.337401	0.588553	0.281059
8.14773	2.30712	0.360916	0.491287	0.490696	0.290772	0.364919	0.614026	0.302255
8.94427	2.41826	0.35837	0.484746	0.499421	0.30676	0.395711	0.642418	0.324831
9.81869	2.51286	0.352668	0.473841	0.50759	0.322792	0.429062	0.673178	0.347871
10.7786	2.5842	0.343805	0.458895	0.515494	0.338447	0.464421	0.706724	0.37079
11.8323	2.62769	0.332414	0.440948	0.523555	0.353581	0.501389	0.743634	0.393536
12.9891	2.64147	0.320032	0.422306	0.532727	0.368759	0.539855	0.784091	0.416782
14.2589	2.62439	0.308381	0.405622	0.543583	0.38476	0.579229	0.826283	0.44131
15.6529	2.57676	0.299023	0.393379	0.555865	0.402397	0.618446	0.866521	0.468016
17.1832	2.50465	0.293853	0.388472	0.569095	0.422976	0.657137	0.901409	0.498779
18.863	2.42296	0.294723	0.39342	0.582329	0.448105	0.696204	0.928574	0.536525
20.7071	2.35381	0.303805	0.411146	0.59561	0.479982	0.738239	0.947644	0.584777
22.7315	2.31541	0.321818	0.442563	0.608631	0.519544	0.78503	0.957551	0.644692
24.9538	2.31156	0.347371	0.486037	0.620917	0.565487	0.835664	0.955683	0.712865
27.3934	2.32544	0.376277	0.536186	0.631065	0.613161	0.885054	0.938506	0.780101
30.0714	2.32604	0.402904	0.5856	0.637714	0.655699	0.925437	0.904962	0.833971
33.0113	2.28386	0.422963	0.628415	0.64136	0.686715	0.950032	0.86044	0.863879
36.2385	2.18739	0.435533	0.663203	0.645132	0.702665	0.955977	0.816758	0.865451
39.7813	2.05199	0.444098	0.694931	0.655365	0.704705	0.946002	0.788629	0.842671
43.6704	1.91158	0.454558	0.732371	0.67926	0.697716	0.926561	0.787002	0.805475
47.9397	1.80206	0.472825	0.784503	0.722628	0.688382	0.905	0.814694	0.765573
52.6264	1.74601	0.502879	0.856796	0.787794	0.683038	0.887167	0.865562	0.732543

Tableau 3b (Suite) : Volume de distribution de fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base de boues d'industrie de jus de pomme (b). Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (μm)	Volume (%)							
	Contrôle	POM	POM+EL	POM+GB	POM+FS	POM+FS+G B	POM+GB+E L	POM+FS+ EL
57.7713	1.74657	0.546173	0.949824	0.873349	0.686301	0.876289	0.928165	0.711684
63.4192	1.79147	0.602962	1.0616	0.976807	0.701508	0.873988	0.993399	0.704778
69.6192	1.85885	0.67352	1.1911	1.09773	0.731306	0.881112	1.06058	0.711418
76.4253	1.92436	0.75927	1.34214	1.24084	0.778442	0.898307	1.13817	0.7306
83.8969	1.96677	0.86162	1.5235	1.41545	0.845608	0.92526	1.23673	0.7611
92.0988	1.97467	0.98083	1.74666	1.63322	0.935076	0.959972	1.36035	0.801149
101.103	1.96292	1.11645	2.02367	1.90629	1.05007	1.00138	1.50479	0.850383
110.987	1.97087	1.26904	2.36511	2.2454	1.19636	1.0538	1.66457	0.912873
121.837	2.03574	1.44395	2.77831	2.65843	1.38297	1.13052	1.84544	0.9999
133.748	2.15702	1.64733	3.25666	3.14006	1.61538	1.24826	2.06395	1.12537
146.824	2.25925	1.87778	3.76845	3.66111	1.8852	1.41467	2.3314	1.29549
161.177	2.21454	2.11419	4.24512	4.15681	2.15857	1.61214	2.62633	1.49476
176.935	1.92441	2.3147	4.59438	4.53841	2.37996	1.79291	2.8817	1.68171
194.232	1.40308	2.43097	4.73282	4.72342	2.49246	1.8953	3.00397	1.80228
213.221	0.76977	2.43793	4.63206	4.67928	2.4713	1.88167	2.92904	1.822
234.066	0.28496	2.358	4.34385	4.44908	2.3447	1.7711	2.67763	1.75414
256.948	0.05265	2.25922	3.98136	4.13643	2.18554	1.63777	2.36141	1.66025
282.068	0.00388	2.22688	3.66823	3.86012	2.0771	1.57321	2.12608	1.62034
309.644	0	2.32614	3.48074	3.69833	2.07547	1.64326	2.07623	1.6959
339.916	0	2.57989	3.42157	3.66122	2.19221	1.86795	2.24175	1.91012
373.147	0	2.95786	3.42177	3.68792	2.39502	2.21286	2.56998	2.24017
409.626	0	3.3822	3.36963	3.67208	2.62042	2.59629	2.93425	2.62255
449.672	0	3.75687	3.16303	3.50867	2.80664	2.9251	3.18211	2.98144
493.633	0	4.00831	2.7614	3.14475	2.92185	3.14356	3.21433	3.26603
541.892	0	4.11704	2.2113	2.60595	2.98704	3.26304	3.03813	3.47883

Tableau 3b (Suite : Volume de distribution de fréquence $dQ_3(x)$ en fonction de la taille des particules des diètes à base de boues d'industrie de jus de pomme (b). Erreur standard de la méthode: 10 – 12%

Diamètre (µm)	Volume (%)							
	Contrôle	POM	POM+EL	POM+GB	POM+FS	POM+FS+GB	POM+GB+EL	POM+FS+EL
594.869	0	4.10743	1.62129	1.98211	3.04802	3.33877	2.7458	3.65575
653.025	0	4.0248	1.1082	1.38132	3.14934	3.43556	2.45338	3.84
716.866	0	3.89969	0.73556 2	0.881785	3.29363	3.58123	2.23322	4.03981
786.949	0	3.73432	0.50939 2	0.514621	3.44867	3.74831	2.09422	4.21861
863.883	0	3.52058	0.39286 5	0.272727	3.56057	3.87822	1.99304	4.31716
948.338	0	3.24875	0.34937 1	0.127037	3.58326	3.89717	1.87171	4.27483
1041.05	0	2.93122	0.34708 3	0.055245 2	3.49412	3.76851	1.6951	4.07381
1142.83	0	2.6053	0.37387 6	0.026715 6	3.33871	3.50826	1.47938	3.7601
1254.55	0	2.2717	0.41221 4	0.017857 6	3.11955	3.1178	1.2527	3.35394
1377.2	0	1.92518	0.43882 9	0.012000 2	2.85139	2.62182	1.04177	2.88644
1511.84	0	1.52969	0.43711 1	0.004932 3	2.50509	2.02252	0.84540	2.33678
1659.64	0	1.21701	0.40982 4	0.000892 5	2.20737	1.55116	0.704413	1.90184
1821.89	0	0.91320 9	0.40203 7	2.67E-05	1.96282	1.11488	0.581694	1.48532
2000	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 4 : Ratio des paramètres d'élevage (larves / œufs; adultes / larves; œufs / femelles) sur les différentes diètes en relation avec les tailles de particules. Erreur standard de la méthode: 10-12%

Diètes	Larves/œufs	adultes/larves	Œufs/femelles	Taille moyenne D43
Contrôle	0.71	0.36	3.00	110.94
EMB + GB	0.48	0.29	2.50	867.01
EMB + FS	0.66	0.26	2.67	33
EMB+ EL	0.50	0.23	2.00	24.249
EMB+GB+FS	0.74	0.40	1.50	63.26
EMB+GB+EL	0.48	0.33	1.33	63.96
EMB+FS+EL	0.69	0.33	1.33	830.07
POM+EMB	0.58	0.27	2.50	88.05
POM + GB	0.65	0.18	3.00	114.69
POM+FS	0.42	0.20	3.00	162.46
POM +EL	0.38	0.20	3.00	602.98
POM+GB+FS	0.64	0.25	1.50	674.42
POM+GB+EL	0.58	0.20	2.50	371.91
POM+FS+ EL	0.60	0.33	1.67	134.74

Les résultats observés sur les graphes du volume de distribution de la taille des particules de la Figure 3 permettent d'attribuer à chaque élément une taille de particules définie par un pic des histogrammes formant une cloche:

- Emb: 7.5µm □ Emb/30: 5.2µm □ Emb7/30: 4.1µm □ Emb10/30: 2.6µm
- Pom: 203.5µm □ Pom/30: 178µm □ Pom7/30: 135µm □ Pom10/30: 98µm
- El: indiscernable, car se dissous en solution
- Gb: ± 200µm □ Fs: ≥ 500µm

Tableau 5 : Profil des nutriments (protéines, lipides et glucides) assimilés par les larves du carpocapse de pomme élevées sur les différentes diètes comme en fonction de la taille des particules. Erreur standard de la méthode: 10%-12%

Diètes	Taille des Particules (μm)	Viscosité (mPa.s)	Lipide assimilée (g)	Glucides assimilées (g)	Protéines Assimilées (g)
Contrôle	110.94	73	0.437	1.02	0.95
EMB + GB	867.01	1867	0.22	0.8	0.8
EMB + FS	33	1266	0.23	0.8	1.3
EMB+ EL	24.249	2396	0.22	0.63	0.6
EMB+GB+FS	63.26	268	0.7	1.6	1.8
EMB+GB+EL	63.96	905	0.34	1.1	1.1
EMB+FS+EL	830.07	763	0.6	0.9	1.2
POM+EMB	88.05	2687	0.2	0.53	0.5
POM + GB	114.69	974	0.21	0.7	0.75
POM+FS	162.46	844	0.22	0.76	1.1
POM +EL	602.98	1414	0.21	0.61	0.58
POM+GB+FS	674.42	435	0.65	1.1	1.6
POM+GB+EL	371.91	720	0.27	0.8	0.7
POM+FS+ EL	134.74	593	0.36	0.83	0.8

Annexe III

Données de l'article 3 du chapitre II:

**Optimization of agro-industrial diets for rearing
of *Cydia pomonella***

Tableau 1 : Graphique des réponses de surface du pourcentage d'élevage des diètes EMB-GB (a); EMB-FS (b); POM-FS (c) et EMB-POM. Fitted surface; Variable: % Larvae; 5 factors, 1 Blocks, 48 Runs; MS Pure Error = 1.1.

Diètes	POM	EMB	FS	GB	EL	%Larves
1	0	0	0	0	0	8
2	0	0	0	0	2	10
3	0	0	0	2.4	0	15
4	0	0	0	2.4	2	20
5	0	0	7	0	0	25
6	0	0	7	0	2	28
7	0	0	7	2.4	0	34
8	0	0	7	2.4	2	80
9	0	10	0	0	0	56
10	0	10	0	0	2	60
11	0	10	0	2.4	0	63
12	0	10	0	2.4	2	65
13	0	10	7	0	0	76
14	0	10	7	0	2	69
15	0	10	7	2.4	0	65
16	0	10	7	2.4	2	55
17	13	0	0	0	0	43
18	13	0	0	0	2	46
19	13	0	0	2.4	0	53
20	13	0	0	2.4	2	58
21	13	0	7	0	0	66
22	13	0	7	0	2	58
23	13	0	7	2.4	0	55
24	13	0	7	2.4	2	49
25	13	10	0	0	0	48
26	13	10	0	0	2	35
27	13	10	0	2.4	0	37
28	13	10	0	2.4	2	33
29	13	10	7	0	0	40
30	13	10	7	0	2	35
31	13	10	7	2.4	0	31
32	13	10	7	2.4	2	29
33	0	5	3.5	1.2	1	34
34	7.5	0	3.5	1.2	1	35
35	7.5	5	0	1.2	1	42
36	7.5	5	3.5	0	1	45
37	7.5	5	3.5	1.2	0	47
38C	7.5	5	3.5	1.2	1	52
39C	7.5	5	3.5	1.2	1	52
40C	7.5	5	3.5	1.2	1	52
41C	7.5	5	3.5	1.2	1	52
42C	7.5	5	3.5	1.2	1	52

Tableau 2 : Profil de la viscosité des diètes produites: (a) avec gélose et (b) sans gélose, comme une fonction de temps. $\pm$ Erreur standard de la méthode = 10-12%; n = 5

Viscosité des diètes (mPa.s)							
Temps (s)	gélose	Contrôle sans gélose	Contrôle+gél ose	POM sans gélose	EMB sans gélose	POM + gélose	EMB + gélose
2	30	146	1952	273	846	2186	2696
4	32	144	1971	255	828	2197	2706
6	32	142	1985	238	820	2207	2718
8	32	140	1992	231	814	2217	2727
10	32	140	1992	223	804	2217	2727
12	32	138	1992	217	792	2217	2727
14	32	136	1992	213	786	2219	2729
16	34	134	1997	207	774	2219	2729
18	36	132	2010	192	765	2221	2731
20	38	132	2017	181	747	2221	2731
22	38	132	2017	178	711	2223	2733
24	38	130	2017	175	703	2223	2733
26	38	130	2020	170	690	2223	2733
28	40	128	2024	166	672	2226	2735
30	40	128	2024	164	632	2226	2735
32	40	128	2024	164	632	2226	2735
34	40	128	2024	164	632	2226	2735

Annexe IV

Données de l'article 1 du chapitre III:

**Prétraitement des rejets agroindustriels utilisés
comme agents nutritifs alternatifs pour l'élevage
de *Cydia pomonella***

Tableau 1 : Influences des diètes alternatives sur l'élevage du carpocapse de pomme

Diètes	% Éclosions	% Larves	% Chrysalide	% adultes
Diète standard	90	80	65	62
EMB	66	56	32	25
EMB-FS	79	76	37	32
EMB-pH7	56	43	20	17
EMB-pH10	45	36	16	10
EMB-80-45	73	57	38	30
EMB-100-45	80	65	46	35
EMB+FS-80-45	85	80	55	53
EMB+FS-100-45	93	85	66	63
POM	52	43	22	14
POM-FS	68	66	28	19
POM-pH7	40	33	16	13
POM-pH10	35	28	12	9
POM-80-45	59	48	33	29
POM-100-45	62	55	40	35
POM+FS-80-45	71	68	45	39
POM+FS-100-45	75	70	58	43
POM+EMB	51	48	27	22
POM+EMB-80-45	59	58	38	30
POM+EMB-100-45	67	60	49	39

Standard error: $\pm 10\%$ - 12%

Annexe V

Notes

**Composition, Rôle et Coût de chaque composant de la
diète**

1. Rôle de chaque composant de la diète standard de BioTepp

- Agar (14,3g): Agent gélifiant, solidifie la diète;
- Farine de soya (100g): Agent absorbant, Glucide;
- Extrait de levure (23g): Source de protéine, de vitamine;
- Germe de blé (31g): Source de carbone, de glucide;
- Méthyl-para-hydroxybenzoate (1,5g): Agent antimicrobien;
- Acide ascorbique (2,3g): Vitamine C, agent antimicrobien;
- Sucrose (18g): Source de carbon;
- Mixture de sel Wesson (7,4g): Source de minéraux;
- Huile de lin (0,5%): Source de lipide;
- Vitamines Vander Zant (8g): Source de vitamines;
- Eau stérile (730 ml): Agent mouillant, mélange des ingrédients.

2. Définitions

Diète: La diète peut être définie comme un aliment de constitution naturelle (végétale, animale), chimique ou synthétique utilisée pour l'élevage des lépidoptères en vue de produire des agents de biocontrôle. Les diètes d'insectes sont des composés complexes et dynamiques, constitués d'ingrédients en interaction entre eux (l'eau, l'oxygène et les agents oxydants).

Extrait de levures: Les levures ont la faculté de synthétiser de nombreuses vitamines du groupe B, ainsi que des acides aminés essentiels, des nucléoprotéines, du glutathion, des diastases (alcoolase, maltase), des ferments protéolytiques voisins de la trypsine, etc. **Levure (1,8g):** Protéine (0,7g); Lipide (0,08g); glucide (0,7g); Ca (1,2mg); Fe (0,3mg); Mg (1,7mg); P (23,2mg); K (36mg); Na (0,9mg); Zn (0,1mg); Cu (0,009mg); Mn (0,01mg); Sélénium (Trace).

Soja (20g): Protéine (6,9 g); Lipide (4,1g); glucide (7 g); Ca (41mg); Fe (1,3mg); Mg (85,8mg); P (98,8 mg); K (503mg); Na (2,6mg); Zn (0,78mg); Cu (0,58mg); Mn (0,46mg); Sélénium (0,002 mg).

Germe blé (80g) : Protéine (23,3g); Lipide (8,6g); glucide (39,7g); Ca (36 mg); Fe (7,3mg); Mg (256mg); P (917mg); K (758mg); Na (3,2mg); Zn (13,3mg); Cu (0,5mg); Mn (16mg); Sélénium (0,05).

Mixture de sel Wesson: Cette substance est impliquée dans de nombreuses réactions chimiques, biologiques des insectes. Les minéraux sont ajoutés délibérément aux diètes par les mixtures salées. Ce sel est impliqué dans de nombreuses réactions chimiques des phospholipides (K), des protéines et des acides nucléiques (Adiksson et *al.*, 1960). Ce sel est très important lors des activités bioénergétiques de l'ATP (P). Car il stimule les réponses alimentaires des insectes par les ratios appropriés de K de Mg (Cohen, 2001). Les chlorures (ions Cl) universellement exigés par tous les organismes, sont impliqués dans la maintenance du potentiel de membrane (charge électrique) qui est la clé des cellules musculaires et des neurones. La composition de la Mixture de sel Wesson en %p/p est la suivante: Carbonate de calcium (21)-Sulfate de Cuivre 5H₂O (0,039)-Phosphate ferrique (1,470)-Sulfate de Manganèse (anhydre) 0,020-Sulfate de Magnésium (anhydre) 9- Sulfate de potassium d'aluminium (0,009)-Chlorure de potassium (12)-Phosphate de dihydrogène de potassium (31)-Iodure de potassium (0,005)-Chlorure de sodium (10,5)-Fluorure de Sodium (0,057)-Phosphate de tricalcium (1,9).

Vitamine

Une vitamine est une substance organique nécessaire au métabolisme de l'organisme des animaux. Ce sont des compléments indispensables des échanges vitaux. Cette molécule organique est un coenzyme (molécule qui participe au site actif d'une enzyme), qui renferme un ou plusieurs radicaux indispensables à la synthèse d'une enzyme ou d'une hormone. L'organisme n'étant pas capable de les synthétiser, ou en quantité insuffisante, elles doivent être apportées régulièrement et en quantité suffisante par l'alimentation.

Les vitamines solubles dans l'eau comprennent les vitamines B, la vitamine C (acide ascorbique), la choline et la carnitine qui sont des composés essentiels à l'alimentation des larves. La vitamine B fonctionne comme cofacteurs dans beaucoup de voies métaboliques, tel que l'utilisation de l'énergie. La vitamine C est essentielle comme antioxydant et la sclérotisation de la cuticule chez les insectes.

Les vitamines solubles dans les lipides comprenant le complexe des vitamines A (β -carotènes et leurs caroténoïdes relatifs) sont essentielles pendant la formation des pigments (coloration).

Protéines : Tryptophane ; Thréonine (g); Isoleucine (g); Leucine (g); Lysine (G); Méthionine (g); Phénylalanine(g); Valine (g); Arginine (g); Histidine (g); Cystéine; Alanine; Acide aspartique; Acide glutamique; Glycine; Proline; sérine.

Lipides : Acides gras saturé (g); Ac.gras non insaturé (g); Ac.gras poly insaturé (g); Cholestérol (mg); stérole

Glucides: amidon, glucose, saccharose, lactose;

Sels minéraux : Calcium (mg); Fer (mg); Magnésium (mg); Phosphore (mg); Potassium (mg); Sodium (mg); Zinc (mg); Cuivre (mg); Manganèse (mg); Sélénium (mg).

Les lépidoptères (Entomologie): Les lépidoptères constituent un ordre d'insectes holométaboles. Leur larve est appelée chenille, leur nymphe est appelée chrysalide et leur imago est appelé papillon. Les lépidoptères sont classés en différentes familles, parmi lesquelles on trouve par exemple : Saturniidae, Sphingidae, Hesperidae, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae, Lycaenidae, Geometridae, Notodontidae, Arctiidae, Noctuidae...

C'est un Insecte qui a quatre ailes couvertes d'une poussière écailleuse et une trompe roulée en spirale, qui subissent des métamorphoses complètes et dont la larve se nomme chenille et la nymphe chrysalide. Les papillons sont des lépidoptères, ils appartiennent à l'ordre des lépidoptères (Guillaume Lecointre, Hervé Le Guyader, *Classification phylogénétique du vivant*, Belin, 2001. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Arthropode>).

3. L'influence de la température sur les composants de la diète durant la cuisson

La cuisson à forte température altère et modifie la structure des aliments.

- de 40°C à 75°C : toutes les diastases (ferments enzymatiques) disparaissent
- de 60°C à 75°C : disparition de la vitamine C
- de 70°C à 100°C et au-delà : hydrolyse des protéines
- de 90°C à 95°C : destruction des vitamines A, B et E
- autour de 100°C : perte des minéraux et oligo-éléments
- de 110°C à 120°C : oxydation des vitamines liposolubles A et D
- à 120°C et plus: destruction des ultimes vitamines et dissociation des lipides en acides gras et glycérides, puis en eau et goudrons avec formation d'acroléine cancérigène et de benzopyrène.
- **Stérilisation par la chaleur (procédé UHT):** 130°C à 140° C en quelques secondes, puis refroidissement immédiat. La stérilisation inactive l'acide ascorbique. Les protéines et lipides sont dénaturés.
- **Appertisation:** Conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux microorganismes. Traitement par la chaleur à 115 -120° C pour une durée qui dépend de l'aliment.
- **Pasteurisation:** désigne un traitement thermique entre 63°C et 65°C (pasteurisation basse) ou 70°C et 95° C (pasteurisation haute) pendant au moins 30 minutes.

4. Rôle des nutriments pour les insectes

- **Protéines:** Les protéines fibreuses, peu solubles dans l'eau, entrent dans la constitution de la charpente de son organisme (élastine, collagène, kératine) et dans la composition de son squelette. Les protéines globulaires, solubles dans l'eau, sensibles à la chaleur et aux milieux acides et basiques, assurent les activités nécessaires au maintien de la vie cellulaire (enzymes, hormones et anti-corps). Les acides aminés interviennent dans un grand nombre de cycles biochimiques indispensables à la vie: formation de l'urée, cycle de Krebs, etc.

Les glucides: Composants de glycoprotéines ou polysaccharides digérés par les insectes; Construction de la cuticule par le polysaccharide (chitine) et le glycogène permet de stocker l'énergie.

Les lipides: Chez l'insecte permet la construction des cellules membranaires (stéroïdes), des hormones, de sources d'énergie, et comme matière structurale (squelette carboné). Phospholipide pour l'ATP.

5. Rôle des nutriments dans la diète

Protéine: Apporte les aa et favorise les réactions enzymatiques et de synthèse. Les protéines constituent la majeure partie de la nourriture des insectes. Les protéines sont les constituants majeurs des cellules biologiques. Elles leur donnent la forme et la structure exigées. Elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme de la cellule.

Glucide: Composés organiques naturels ou artificiels dans lesquels l'hydrogène et l'oxygène sont combinés avec le carbone. La plupart de ces composés ont pour formule brute $C_m(H_2O)_n$. Apporte dans la diète, le glucose, (sucre, l'amidon), la dextrine, la cellulose et le glycogène.

Lipide: Apporte les acides gras, le glycérol et le stérol dans la composition de la diète.

6. Caractéristiques de la diète et conditions d'un bon élevage

Le pH: Détermine l'acidité ou l'alcalinité de la diète. Influence la saveur, le control microbiens, l'oxydation, la détérioration hydrolytique et la solubilité des nutriments dans la diète. Transit des insectes: $9-10 \pm 0,1$ Diète: $6,3- 6,7 \pm 0,1$.

Photopériode: L'alternance régulière et la durée des jours et des nuits au cours des saisons déclenche chez les insectes des réactions dont l'ensemble constitue le photopériodisme; Ceci influence la croissance, le développement

postembryonique des insectes; Pour les insectes: 16:8 ou 18:6h.

Température: Détermine le chaud et le froid de la diète et d'un milieu; Important pour le métabolisme des insectes; être adapté aux conditions d'élevage de la larve; éviter la croissance microbienne. Diète: 25 à 46°C; Préparée: 70-80°C; Insecte: 15-25.

7. Le coût des ingrédients de la diète standard

Tableau 1 : Le prix des différents ingrédients de la diète

Ingrédients	Prix(\$) par g	Poids (g)	Prix(\$)/Kgdiète	Sources
Agar	251.6	2000.0	1.80	Labmat
Farine de soja	3.85	500.00	0.77	Métro
Extrait de levure	101.61	1000.00	2.34	ICN
Méthyle p-hydrox benzoate	173.65	500.00	0.52	BDH
acide Ascorbique	70.10	2000.00	0.08	Labmat
Sucrose	38.40	2000.00	0,35	Labmat
Mixture de sel Wesson	310.30	5000.00	0.46	Sigma
Germe de blé	81.24	45400.00	0.06	ICN
Huile de lin	20.98	2270.00	0.05	ICN
Vitamines Vander Zant	913.80	5000.00	1.46	Sigma
Total/kg			8.38 \$	

Source: Brar et *al.*, 2008

8 : Production de la diète standard de Biotepp.Inc.

Mode de préparation de la diète standard

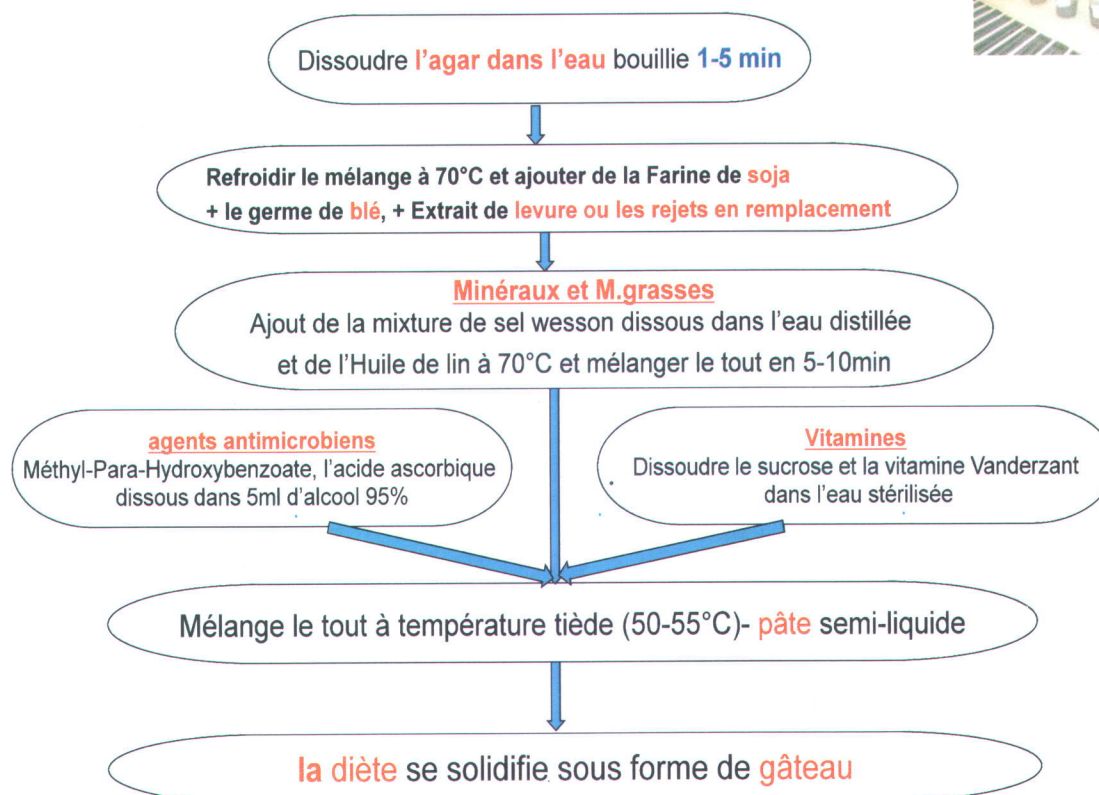


Figure A-5.1 : Mode de préparation de la diète standard

Aspect microscopique des œufs et des larves

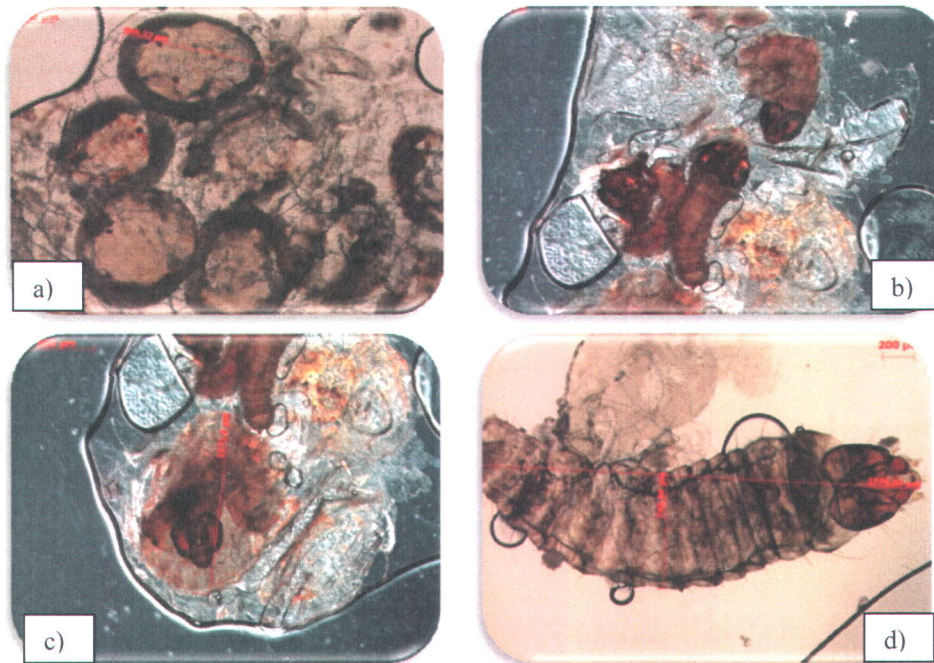


Figure A-5.2: Microscopie électronique (x 40) des œufs et des larves de la PP : a) Lots d'œufs après pontes; b) Œufs éclos; c) Œufs non éclos- présence de larves; d) Larve mature.

Aspect visuel des diètes et des stades d'évolution de la PP

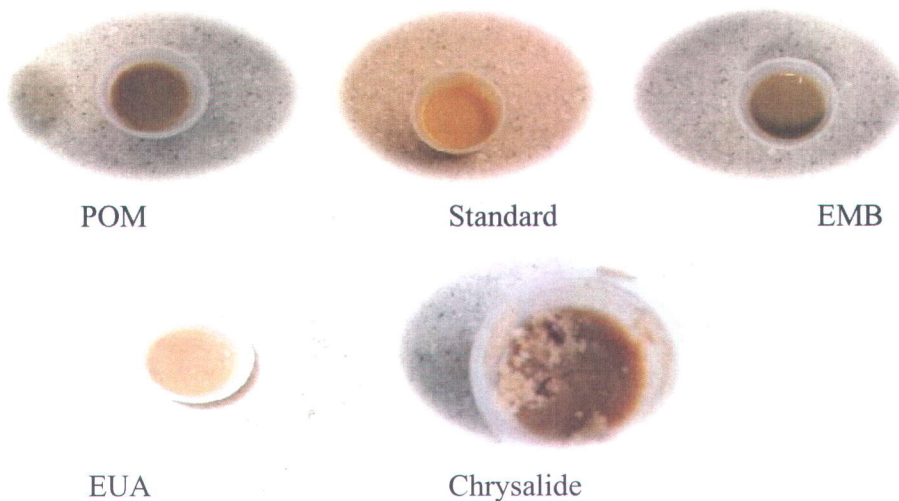


Figure A-5.3: Aspect visuel des différentes diètes produites;

BSM : diète à base de boue de jus de pomme comme agent nutritif; EMB : diète à base des eaux usées de microbrasserie comme agent nutritif; EUA : diète à base des eaux usées d'amidon comme agent nutritif

Annexe VI

Notes

**Présentation des sites et définitions des eaux
usées et des boues d'épuration**

1. Présentation des sites de prélèvements des échantillons

1.1 Eaux usées Agroindustrielles

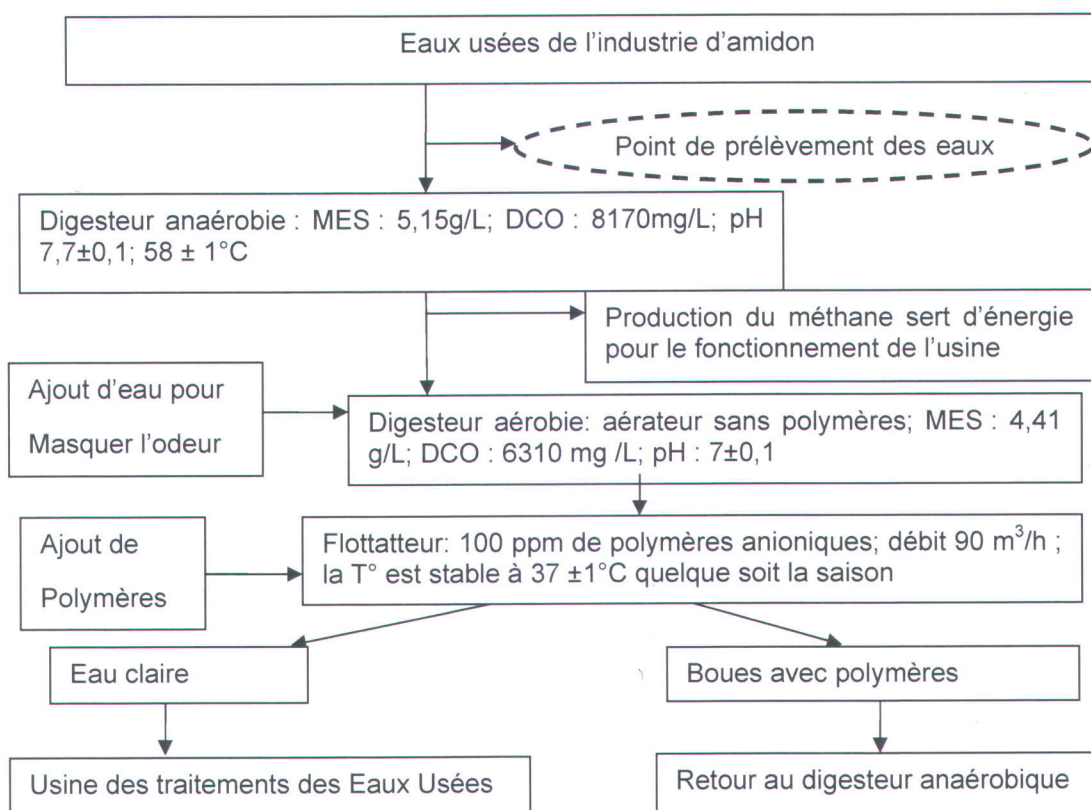


Figure A-6.1 : Schéma de production des Eaux Usées d'Amidon (EUA) prélevé à l'industrie ADM de Montréal.

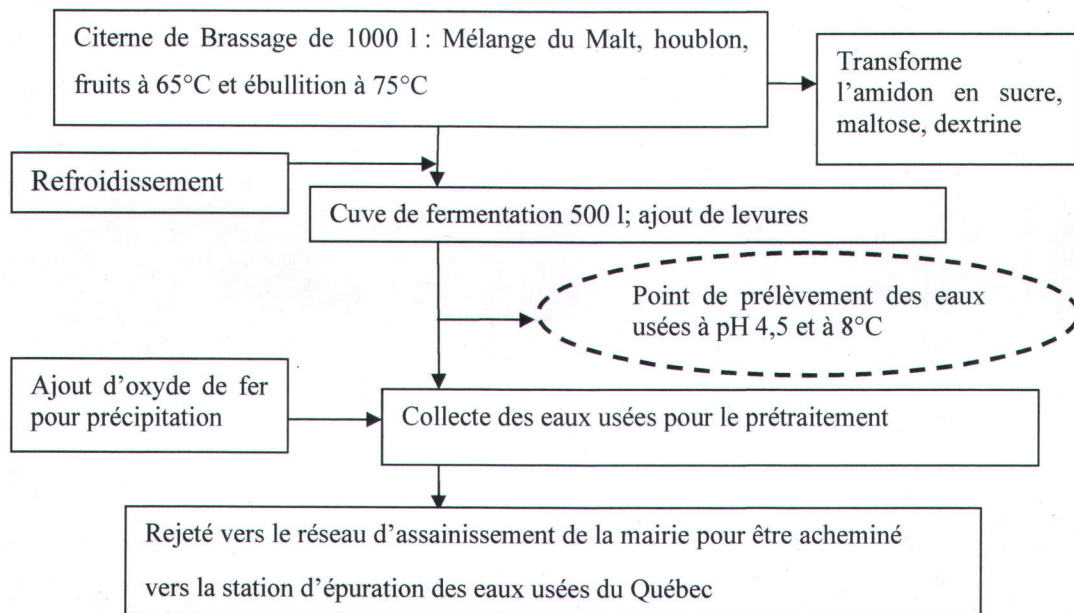


Figure A-6.2 : Schéma de production des eaux usées de micro-brasserie

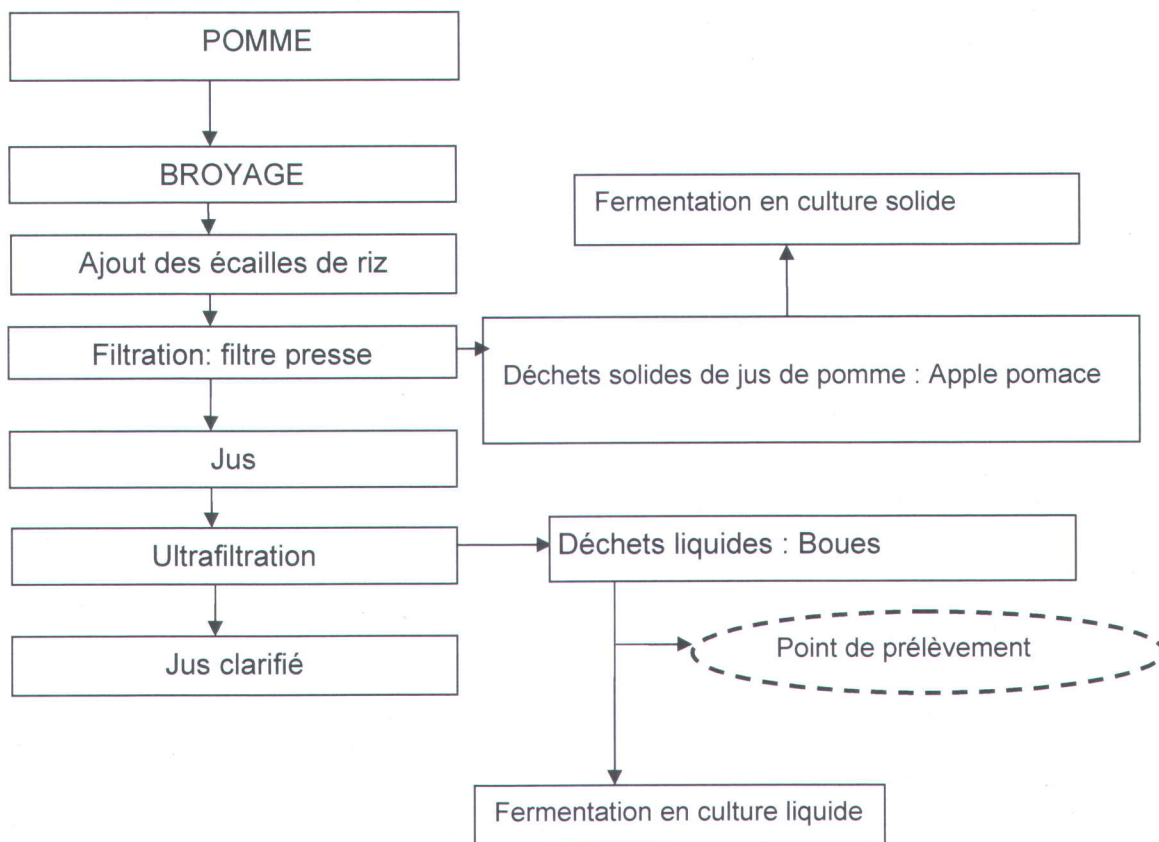


Figure A-6.3 : Schéma de production des eaux usées de pomme

1.2 Boues Secondaires de la Municipalité (BSM)

Cet échantillon est prélevé à la station d'épuration de Québec-Est de type biofiltration.

MES: 27100 kg jr⁻¹ DBO₅: 25600 kg jr⁻¹ débit: 231000 m³ jr⁻¹

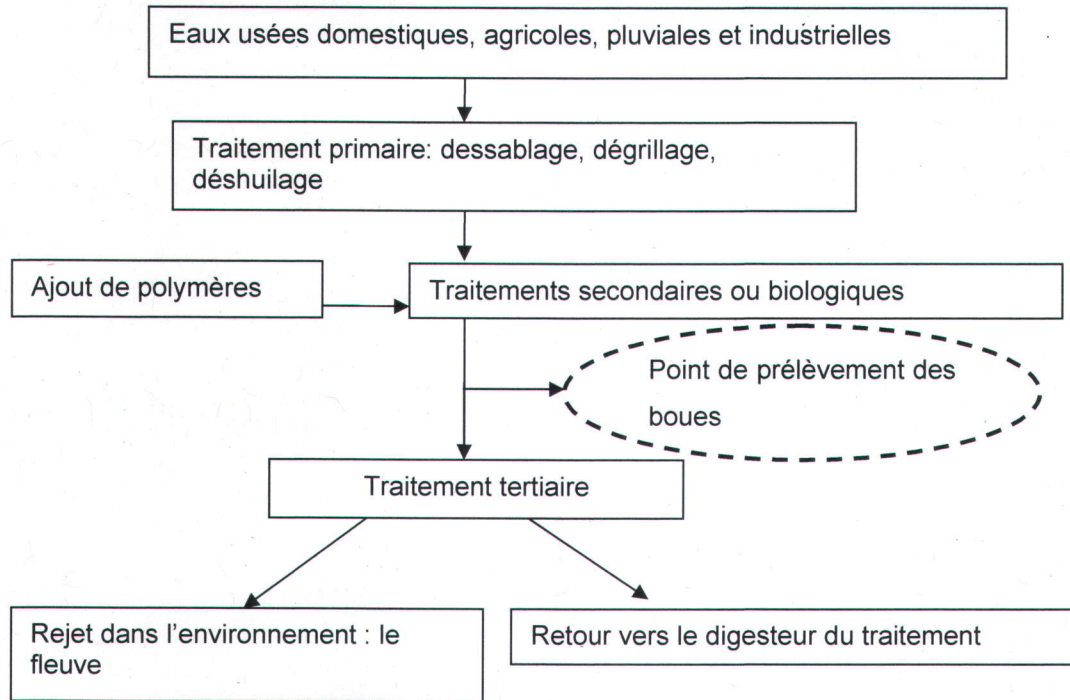


Figure A-6.4 : Schéma de production des boues d'épuration de BSM

2. Définition des eaux usées et des boues d'épuration

Boues= 95% Eau + 5% Matières sèches (De Jong et Staelens, 2003)

Matières sèches = (30% - 50%) Organique + (70% - 50%) Minérale

Composition d'une eau usée domestique

Eau usée = 99,9 % eau + Solides 0,1 %

Solides = Organique 70 % + Inorganique 30%

Organique = 65%Protéines + 25 % Glucides + 10 %Lipides

3. Méthode de calcul statistique

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.stacan.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 Fischer et aux valeurs de probabilité (p) associées. La variance (δ^2) est calculée avec le carré de la somme des déviations de chaque résultat (y_i) par rapport à la moyenne des résultats (m), divisés par le nombre total de résultats n (Box et al., 1976). $\delta^2 = \sum (y_i - m)^2 / n$.

La racine carrée de la variance correspond à l'écart type ou l'erreur standard.

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

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

Erreur de la méthode : pourcentage de variation des résultats expérimentaux obtenus par la méthode dont le degré donne un aperçu de sa reproductibilité. Dans ce travail, l'erreur de la méthode a été mesurée avec la moyenne (m) et l'écart type des résultats (δ^2) 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 : Erreur de la méthode (%) = $(m / \delta^2) \times 100$.

