

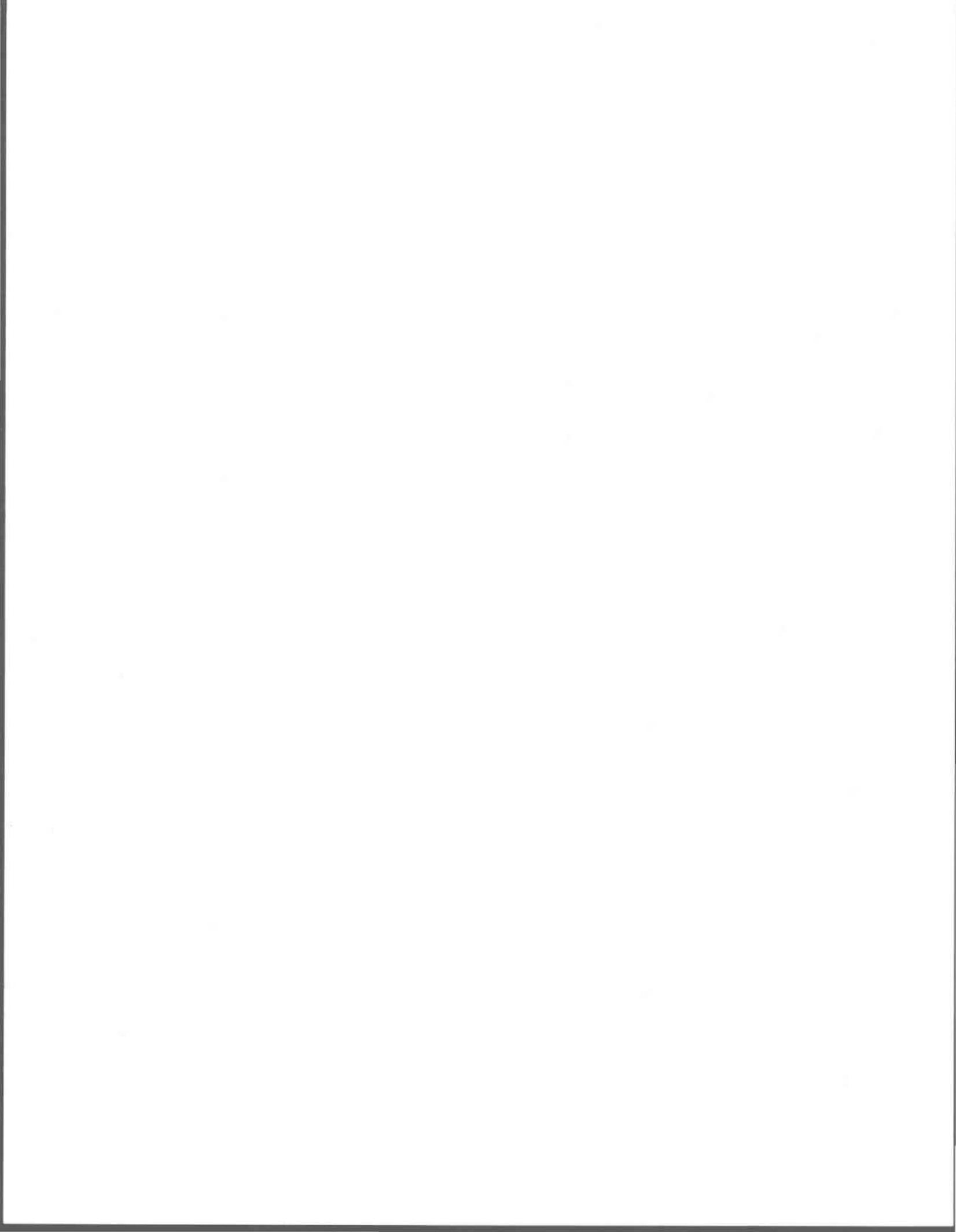
Université du Québec  
INRS-Eau

**UTILISATION DES BOUES D'ÉPURATION COMME  
SUBSTRAT POUR LA PRODUCTION DE BIOPESTICIDES :  
INDUCTION ABIOTIQUE DE LA SPORULATION CHEZ  
*BACILLUS THURINGIENSIS***

Par  
Simon Barnabé

Mémoire  
présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences de l'eau

5 mai 2000



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie mon directeur de maîtrise, M. Rajesh D. Tyagi, pour son enseignement, ses encouragements et le suivi attentionné de mes travaux. Je tiens tout particulièrement à remercier mon co-directeur de maîtrise, M. José R. Valéro, pour les informations et les commentaires pertinents qu'il m'a livrés et pour sa disponibilité et le temps qu'il m'a accordé durant ma maîtrise.

Un grand merci à M. Ambarish Vidyharti pour avoir partagé ses connaissances et prodiguer de bons conseils. Je tiens à souligner aussi l'aide technique et le soutien moral de M. Martin Desrosiers durant mes travaux au laboratoire.

Finalement, mes remerciements aux techniciens et employés de l'INRS-eau qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de cette maîtrise.



## RÉSUMÉ

La production des biopesticides comme ceux à base de *Bacillus thuringiensis* sont coûteux et nécessite un substrat de fermentation peu dispendieux et disponible pour favoriser leur commercialisation. Les boues d'épuration peuvent être utilisées comme milieu alternatif pour être à la fois une solution aux problèmes de gestion des boues et à la forte compétition du marché des insecticides chimiques et biologiques. Un procédé de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* est étudié par le Groupe en Assainissement de l'INRS-eau et les suspensions obtenues ne sont toujours pas en mesure de pouvoir rivaliser avec les préparations à base de *Bacillus thuringiensis* déjà commercialisées. L'optimisation du procédé par des facteurs biotiques et abiotiques fait l'objet de plusieurs recherches. L'induction de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis* par des changements de température ou de pH au début ou durant la phase de sporulation et de production des entomotoxines est proposée pour maximiser la sporulation et l'entomotoxicité. Une suspension de *Bacillus thuringiensis* contenant 90% de spores avec une entomotoxicité de  $9,5 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l ou plus est recherchée.

Plusieurs expériences préliminaires ont été réalisées en erlenmeyers dans lesquelles divers chocs thermiques et de pH ont été appliqués lors de la fermentation de boues mixtes ou secondaires. Deux souches bactériennes ont été comparées : *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* et *Bacillus thuringiensis* no.11. Les chocs de pH peuvent augmenter le taux de sporulation et l'entomotoxicité de *Bacillus thuringiensis* lorsqu'ils sont appliqués durant la phase de sporulation. Ils augmentent la disponibilité des éléments nécessaires à la formation des spores et à la production de métabolites secondaires comme les entomotoxines. Les chocs thermiques n'ont pas eu d'effet significatif sur les taux de sporulation ou l'entomotoxicité et peuvent avoir favorisé le métabolisme pour la croissance cellulaire au détriment de celui pour la sporulation et la production d'entomotoxines. Les boues secondaires ont permis l'obtention de concentrations élevées en spores et *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* réagit plus favorablement aux chocs de pH que *Bacillus thuringiensis* no.11. Les expériences préliminaires avec les plus forts taux de sporulation et entomotoxicités ont été reproduites dans des bioréacteurs permettant le contrôle continu de la température, du pH, de l'agitation et de l'aération. Après l'application de chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*,  $6,6 \times 10^8$  spores/ml dans une proportion de 90,4% avec une entomotoxicité de  $13,1 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l sont obtenus en comparaison à  $2,7 \times 10^8$  spores/ml dans une proportion de 73% avec une entomotoxicité de  $10,3 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l pour une fermentation dans les mêmes conditions sans choc de pH. De plus, le temps de fermentation peut passer de 48 à 36 heures, puisque les plus fortes entomotoxicités sont dans la majorité des cas obtenues après 30 ou 36 heures de fermentation. L'importance accordée au nombre de spores dans les suspensions de *Bacillus thuringiensis* doit être révisée, puisque le produit peut être très entomotoxique sans qu'il y ait nécessairement une haute concentration en spores. Finalement, l'effet des chocs de pH sur le métabolisme ou la disponibilité des éléments demande plus d'études et représente certainement un intérêt pour l'optimisation des procédés en biotechnologie et en microbiologie industrielle.



# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	iii
Résumé.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	xv
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problématique de la gestion des déchets.....	1
1.2 La valorisation des déchets solides.....	2
1.3 Pesticides.....	3
1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	5
1.4.1 Caractéristiques générales.....	5
1.4.2 Croissance et métabolisme.....	6
1.4.3 Sporulation.....	8
1.4.3.1 Structure de la spore.....	8
1.4.3.2 Génétique de la sporulation.....	10
1.4.3.3 Formation des spores.....	12
1.4.3.4 Facteurs biotiques influençant la formation des spores.....	14
1.4.3.4.1 Influence des molécules organiques.....	14
1.4.3.4.1.1 Sources de carbone.....	14
1.4.3.4.1.2 Sources d'azote.....	15
1.4.3.4.2 Influence des molécules inorganiques.....	16
1.4.3.5 Facteurs abiotiques influençant la formation des spores.....	17
1.4.3.5.1 Les effets du pH.....	17
1.4.3.5.2 Les effets de la température.....	18
1.4.3.5.3 Les effets de l'agitation et de l'aération.....	18
1.4.3.6 Germination des spores.....	19
1.4.4 Entomotoxicité.....	21
1.4.4.1 Les $\delta$ -endotoxines et leur mode d'action.....	22
1.4.4.2 La formation des cristaux protéiques.....	23
1.4.4.3 Facteurs biotiques et abiotiques influençant la toxicité.....	24
1.5 Hypothèse de travail.....	26
1.6 Objectifs de recherche.....	27
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>29</b>
2.1 Boues d'épuration.....	29
2.2 Souches bactériennes.....	30
2.3 Fermentation.....	31
2.3.1 Expériences préliminaires en erlenmeyers.....	31
2.3.2 Expériences en bioréacteur 15 L.....	31
2.3.3 Précisions sur les variations brusques des paramètres abiotiques.....	33
2.4 Dénombrements des cellules et des spores viables.....	33
2.5 Expériences.....	34
2.6 Bioessais.....	36
<b>3. RÉSULTATS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Fermentation des boues d'épuration par Bt var. <i>kurstaki</i> .....	37

3.2 Chocs de pH, expériences préliminaires en erlenmeyers.....	40
3.2.1 Btk dans les boues mixtes.....	41
3.2.2 Bt-11 dans les boues mixtes.....	47
3.2.3 Btk et Bt-11 dans les boues secondaires.....	50
3.3 Chocs thermiques, expériences préliminaires en erlenmeyers.....	54
3.4 Compte rendu des expériences préliminaires en erlenmeyers.....	56
3.5 Expériences en bioréacteur (15 L).....	56
3.5.1 Contrôle.....	56
3.5.2 Un choc de pH acide.....	59
3.5.3 Plusieurs chocs de pH acide.....	61
3.5.4 Évolution du CO <sub>2</sub> durant les chocs de pH.....	69
3.5.5 Chocs de pH basique-acide.....	72
4. DISCUSSION.....	79
4.1 Fermentation des boues d'épuration par Btk.....	79
4.1.1 Comportement de Btk dans les boues d'épuration.....	79
4.1.1.1 Diffusion de l'oxygène dans les boues d'épuration.....	81
4.1.1.2 Effet de la composition des boues d'épuration.....	82
4.1.1.3 Autres facteurs influençant la croissance, la sporulation et l'entomotoxicité.....	84
4.1.1.3.1 La mousse.....	84
4.1.1.3.2 L'inoculum et le taux de croissance.....	85
4.1.2 Comportement de Bt-11 dans les boues d'épuration.....	85
4.2 Effets des chocs de pH sur la sporulation et l'entomotoxicité.....	86
4.2.1 Influence sur la disponibilité des éléments nécessaires à la sporulation et à la production de toxines.....	87
4.2.2 Réduction du temps de fermentation.....	89
4.2.3 Comportement de Bt-11 vis-à-vis les chocs de pH.....	89
4.3 Effets des chocs thermiques sur la sporulation et l'entomotoxicité.....	90
5. CONCLUSION.....	91
6. RÉFÉRENCES CITÉES.....	93

## ANNEXES

- 1- COMPOSITION DU REGIME ALIMENTAIRE
- 2- SERIES D'EXPERIENCES NO. 1-6
- 3- SERIE D'EXPERIENCE NO.7
- 4- CONTRÔLE BOUES MIXTES
- 5- CONTRÔLE BOUES SECONDAIRES
- 6- EXPÉRIENCE A
- 7- EXPÉRIENCE B
- 8- EXPÉRIENCE C
- 9- EXPÉRIENCE D
- 10- EXPÉRIENCE E
- 11- EXPÉRIENCES D ET E : CO<sub>2</sub>
- 12- EXPÉRIENCE F
- 13- EXPÉRIENCE G
- 14- BIOESSAIS

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Évaluation annuelle présente et future du marché des biopesticides. Le marché global des insecticides est évalué à plus de 8 milliards de dollars (Freitelson, 1992 ; Lisansky, 1997 ; Georgis, 1997).....	4
<b>Tableau 2:</b>	Gènes codant pour des endotoxines (Lereclus et al., 1989 ; Cooper, 1994 ; Höfte et Whiteley, 1989 ; Sarjeet et al., 1992) . Jusqu'à maintenant, plus de 42 gènes codant pour des $\delta$ -endotoxines ont été caractérisés (Ellar, 1997). Ce tableau ne contient que les gènes les plus documentés.....	23
<b>Tableau 3:</b>	Caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes et secondaires de la CUQ.....	29
<b>Tableau 4:</b>	Concentration en cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de la fermentation de boues mixtes (CUQ 07-05-99) ou secondaires (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Résultats après 48 heures en comparaison avec la préparation commerciale Foray™.....	37
<b>Tableau 5:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Btk (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats des séries d'expériences no.1, 2 et 3 après 48 heures de fermentation.....	41
<b>Tableau 6:</b>	Dénombrement des spores et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Btk (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats des séries d'expériences no.1, 2 et 3.....	42
<b>Tableau 7:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Bt-11 (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.4 après 48 heures.....	47
<b>Tableau 8:</b>	Dénombrement des spores et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Bt-11 (CUQ 07-05-99, M.E.S. $\approx$ 18 g/L) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.4.....	49
<b>Tableau 9:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues secondaires par Bt-11 (CUQ 25-06-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.5 et 6 après 48 heures.....	50
<b>Tableau 10:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues secondaires par Bt-11 (CUQ 25-06-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.5 et 6.....	53

<b>Tableau 11:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.7 après 48 heures.....	54
<b>Tableau 12:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.7.....	54
<b>Tableau 13 :</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A, contrôle.....	57
<b>Tableau 14 :</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience B, pH 7->6->7 (15-18 h).....	59
<b>Tableau 15 :</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 25-07-99) en bioréacteur. Expérience B (pH 7->6->7, 15-18 h) en comparaison avec A (contrôle).....	61
<b>Tableau 16:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A: contrôle, pH 7 ; expérience C: pH 7->6->7 (15-18, 24-27 h) ; expérience D: pH 7->6->7 (T=15-18, 24-27, 30-33 h) et pH 7->6 (T=36-48 h) ; expérience E: pH 7->6->7 (T=15-16, 19-20, 23-24, 27-28, 31-32 h) et pH 7->6 (T=36-48 h).....	62
<b>Tableau 17:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience C (pH 7->6->7, 15-18 et 24-27 h) en comparaison avec A (contrôle).....	65
<b>Tableau 18:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience D (pH 7->6->7 de 15-18, 24-27 et 30-33 h, pH 7->6 de 36-48 h) en comparaison avec A (contrôle).....	66
<b>Tableau 19:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience E (pH 7->6->7 de 15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h ainsi que pH 7->6 de 36-48 h) en comparaison avec A (contrôle).....	68

<b>Tableau 20:</b>	Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A: contrôle, pH 7 ; expérience F: pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h) ; expérience G: pH 7->8->7 (T=15-18 h) et pH 7->8->6 (24-27-48 h).....	72
<b>Tableau 21:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience F (pH 7->8->6 de 15-18-24 et 30-33-48 h) en comparaison avec A (contrôle).....	75
<b>Tableau 22:</b>	Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience G (pH 7->8->7 de 15-18 et pH 7->8->6 de 27-30-48 h) en comparaison avec A (contrôle).....	76
<b>Tableau 23 :</b>	Comparaison avec la préparation commerciale Foray™.....	89
<b>Tableau 24 :</b>	Composition du régime alimentaire pour l'élevage de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et quantité des ingrédients pour 1 litre d'aliment	105
<b>Tableau 25 :</b>	Valeur des dénombrements de cellules et de spores viables, du taux de sporulation et de l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes (CUQ, 07/05/99) ou secondaires (CUQ, 25/06/99) par Btk ou Bt-11 en erlenmeyers. Chocs de pH : expériences préliminaires en erlenmeyers.....	106
<b>Tableau 26 :</b>	Valeur des dénombrements de cellules et de spores viables, du taux de sporulation et de l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues secondaires (CUQ, 25/06/99) par Btk ou Bt-11 en erlenmeyers. Chocs thermiques : expériences préliminaires en erlenmeyers.....	109
<b>Tableau 27 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues mixtes (CUQ, 07-05-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues mixtes.	110
<b>Tableau 28 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le et le pH durant une fermentation de boues mixtes (CUQ, 07-05-99) par Btk dans un bioréacteur. Contrôle boues mixtes.....	110
<b>Tableau 29 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) en bioréacteur. Contrôle boues secondaires.....	113
<b>Tableau 30 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues secondaires.....	113
<b>Tableau 31 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience A :</b> contrôle boues secondaires en bioréacteur.....	117

<b>Tableau 32 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience A :</b> contrôle boues secondaires.....	117
<b>Tableau 33 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience B :</b> choc de pH 7->6->7 (15-18 h).....	121
<b>Tableau 34 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience B :</b> choc de pH 7->6->7 (15-18 h).....	121
<b>Tableau 35 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience C :</b> 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h).....	125
<b>Tableau 36 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience C :</b> 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h).....	125
<b>Tableau 37 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience D :</b> 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).....	129
<b>Tableau 38 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience D :</b> 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).....	129
<b>Tableau 39 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience E :</b> 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).....	133
<b>Tableau 40 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience E :</b> 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).....	133
<b>Tableau 41 :</b>	Données brutes pour le suivi du CO <sub>2</sub> durant la fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience D :</b> 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). <b>Expérience E :</b> 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).....	137
<b>Tableau 42 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience F :</b> 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h).....	138

<b>Tableau 43 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience F :</b> 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h).....	138
<b>Tableau 44 :</b>	Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience G :</b> un choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).....	142
<b>Tableau 45 :</b>	Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. <b>Expérience G :</b> 1 choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).....	142
<b>Tableau 46 :</b>	Bioessais sur des larves de <i>Choristoneura fumiferana</i> (TBE) et évaluation de l'entomotoxicité de plusieurs échantillons de boues mixtes ou secondaires fermentées par Btk après divers temps (T). Séries d'expériences no.1 à 3 : Btk dans les boues mixtes. Série no.4 : Bt-11 dans les boues mixtes. Séries no.5 et 7 : Btk dans les boues secondaires. Série no.6 : Bt-11 dans les boues secondaires. Expérience A : contrôle en bioréacteur, Btk dans les boues secondaires. Expérience B : choc de pH 7->6->7 (15-18 h). Expérience C : 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h). Expérience D : 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). Expérience E : 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). Expérience F : 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h). Expérience G : un choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).....	146



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Courbe de croissance bactérienne typique en système fermé (Pelczar, 1993) : (a) phase de latence ; (b) phase exponentielle ; (c) phase stationnaire ; (d) phase de mortalité.....	7
<b>Figure 2:</b> Structure d'un endospore (Gould, 1969).....	9
<b>Figure 3:</b> Génétique de la sporulation chez <i>Bacillus sp.</i> , gènes principaux (Smith, 1989).....	11
<b>Figure 4:</b> Schéma de la germination des spores, la croissance végétative, la sporulation et de la production de toxines chez la bactérie entomopathogène <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	13
<b>Figure 5:</b> Schéma des expériences à réaliser pour atteindre les objectifs du projet.....	35
<b>Figure 6:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, pH 7, 300 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq 20\%$ d'oxygène dissous dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues mixtes (CUQ 07-05-99). Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,39/h.....	38
<b>Figure 7:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk et suivi de l'oxygène dissous lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, pH 7, 300 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq 20\%$ d'oxygène dissous dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,43/h.....	39
<b>Figure 8:</b> Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.1) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).....	43
<b>Figure 9:</b> Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.2) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).....	44
<b>Figure 10:</b> Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.3) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).....	45
<b>Figure 11:</b> Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.4) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).....	48
<b>Figure 12:</b> Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.5) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 25-06-99).....	51

<b>Figure 13:</b> Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.6) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 25-06-99).....	52
<b>Figure 14:</b> Dénombrement des spores viables de Btk après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de 48 h (série d'expériences no.7) à pH 7 et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 23-07-99).....	55
<b>Figure 15:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk lors d'une fermentation de 48 heures dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99) à pH 7, 30°C, 300-500 rpm et $\geq$ 20% d'oxygène dissous. Expérience A. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,38/h.....	58
<b>Figure 16:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application d'un choc de pH 7->6->7 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience B. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,49/h.....	60
<b>Figure 17:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH 7->6->7 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, à 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience C. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,52/h.....	63
<b>Figure 18:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de trois chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience D. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,38/h.....	64
<b>Figure 19:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de cinq chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, à 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience E. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,51/h.....	67
<b>Figure 20:</b> Suivi du CO <sub>2</sub> après l'application de trois chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures (expérience D) à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99).....	70
<b>Figure 21:</b> Suivi du CO <sub>2</sub> après l'application de cinq chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures (expérience E) à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et $\geq$ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99).....	71

<b>Figure 22:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires CUQ (23-07-99). Expérience F. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,33/h.....	73
<b>Figure 23:</b> Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires CUQ (23-07-99). Expérience G. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,32/h.....	74



# 1 INTRODUCTION

## **1.1 Problématique de la gestion des déchets**

L'évolution de la société a entraîné une détérioration de l'environnement par l'accumulation de matières résiduelles. Une bonne gestion des déchets s'avère donc essentielle pour préserver nos ressources naturelles et léguer aux prochaines générations un environnement sain capable de supporter les futurs développements technologiques. Avec tous ses problèmes de pollution et soucieuse de son économie, la société accorde maintenant beaucoup d'importance à la valorisation des déchets. Au Québec, plus de 8,3 millions de tonnes de matières résiduelles sont gérées annuellement et seulement 3 millions de tonnes sont valorisées (MEF, 1998a et 1998b). La situation actuelle permet de constater que l'élimination demeure encore l'activité privilégiée dans le domaine de la gestion des matières résiduelles au Québec (MEF, 1995). La gestion des boues d'épuration en est un bon exemple.

En effet, à la suite de l'application du *Programme d'assainissement des eaux du Québec*, l'augmentation du nombre d'usines d'épuration a entraîné une hausse de la quantité de déchets produits et leur élimination est maintenant problématique (Blais, 1999). Actuellement au Québec, la production annuelle de boues provenant des stations de traitement d'eaux usées municipales et des fosses septiques atteint 185 000 tonnes de boues sèches (tbs) (MEF, 1998a). De plus, le traitement des eaux usées industrielles génère une grande quantité de boues : par exemple, celles provenant de papeteries sont évaluées à 600 000 tbs par an (MEF, 1997). La très grande majorité de ces boues est incinérée et l'autre partie est enfouie. L'incinération est une technique coûteuse générant des cendres qui doivent à leur tour être éliminées de façon sécuritaire (MEF, 1998a ; Blais, 1999). L'enfouissement sanitaire est la plus simple et moins coûteuse des solutions. Toutefois, la réduction du nombre de sites appropriés et la hausse de la taxe d'enfouissement causent une diminution de l'intérêt pour cette option (Blais, 1999). La contamination des eaux souterraines par les métaux lourds présents dans les boues constitue également un facteur exerçant de plus en plus de pressions pour que cesse cette pratique (Blais, 1999). Les coûts de traitement et d'élimination peuvent représenter plus de la moitié du budget de la station

d'épuration (Blais, 1999). Il est donc important d'imaginer des solutions économiques pour faire face à l'accroissement de la quantité des boues produites. La valorisation semble être la meilleure option, puisqu'elle utilise le potentiel énergétique et agronomique des boues. L'intérêt environnemental et économique de ce moyen d'élimination incite donc les chercheurs à développer de nouvelles technologies. Plusieurs études, comme celles effectuées par le *Groupe de recherche en assainissement de l'INRS-eau* sur la réduction des métaux lourds dans les boues d'épuration (Tyagi et al., 1993), ont aussi amplifié l'intérêt à transformer les boues en un produit à haute valeur ajoutée.

## 1.2 La valorisation des déchets solides

Diverses alternatives sont possibles pour l'élimination finale des déchets solides dans l'environnement et la valorisation constitue la pratique la plus prometteuse pour les prochaines années. En ce qui a trait aux boues d'épuration, beaucoup de solutions sont suggérées en fonction de leur haute concentration en éléments organiques. La valorisation agricole et sylvicole, la réhabilitation des sols et la production de comestibles sont des façons de recycler les boues d'épuration (Blais, 1999).

L'épandage agricole des boues est largement pratiqué à travers le monde. Au Canada, aux États-Unis et en Europe, cette pratique est utilisée pour disposer respectivement de 29%, 43,5% et 40% de ces rejets. Ces milieux complexes sont riches en éléments nutritifs et leur haute teneur en azote, phosphore et potassium est excellente pour l'amendement des sols. Toutefois, leur concentration élevée en métaux lourds et la présence de pathogènes restreignent leurs utilisations. L'épandage sylvicole est moins fréquent et fait encore l'objet d'études. L'apport des boues en éléments nutritifs contribue à améliorer la fertilité des sols. La restauration des sites miniers est l'une des applications les plus importantes pour la réhabilitation des sols avec des boues. Des huiles peuvent aussi être produites par la transformation des boues à haute température en absence d'oxygène. D'autres formes de valorisation permettent d'obtenir une biomasse pouvant être utilisée dans l'alimentation des animaux de ferme ou encore dans la production de biopesticides pour combattre les insectes nuisibles des forêts.

Cette dernière optique suscite l'intérêt du *Groupe de recherche en Assainissement de l'INRS-eau* qui accentue ses études sur la possibilité d'effectuer la bioconversion des boues d'épuration en biopesticides. L'utilisation de ces derniers au Canada est très importante pour combattre les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE) *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera : Tortricidae) qui ravagent des forêts entières de conifères (Valéro, 1990). À ce propos, parmi tous les agents de contrôle biologique présentement développés comme alternative aux pesticides chimiques, *Bacillus thuringiensis* est le plus prometteur. Toutefois, cette bactérie entomopathogène occupe une faible part du marché mondial des pesticides: de nouvelles biotechnologies doivent donc être découvertes afin d'améliorer son efficacité et réduire le coût de sa production.

### 1.3 Les pesticides

Depuis les dernières décennies, beaucoup d'efforts ont été mis en œuvre pour explorer les moyens biologiques de contrôler les insectes ravageurs des lieux agricoles et forestiers. Cet intérêt s'est accru avec l'antipathie générale face à l'utilisation de pesticides chimiques et leurs conséquences néfastes sur l'environnement : pollution par l'accumulation dans le sol, l'eau, l'air, les produits agricoles et les animaux et apparition de souches d'insectes nuisibles résistants. Les désavantages des pesticides chimiques ont accentué le développement d'agents plus sélectifs pour le contrôle des parasites. L'utilisation des pesticides biologiques est l'une des alternatives préconisées pour remédier aux problèmes environnementaux causés par les pesticides chimiques (Morris, 1982 ; Watkinson, 1994). Les principaux avantages qu'offrent les pesticides biologiques par rapport aux pesticides chimiques sont les suivants (Georgis, 1997 ; Harris, 1997 ; Lisansky, 1997) :

- ils sont biodégradables et ne s'accumulent pas dans les écosystèmes ;
- ils sont spécifiques dans leur spectre d'activité entomotoxique, ce qui leur permet de pénétrer les marchés agricoles et sylvicoles particuliers ;
- il est possible de les combiner avec d'autres agents biologiques pour une meilleure efficacité ;
- ils sont sans danger pour l'humain, les animaux et les plantes ;
- ils sont une excellente alternative pour combattre les insectes devenus résistants aux pesticides chimiques.

Toutefois, le prix des biopesticides est encore plus élevé que celui des pesticides chimiques, ce qui réduit leur utilisation (Georgis, 1997). Les biopesticides occupent environ 1 % du marché mondial des insecticides (Harris, 1997). Les plus populaires des biopesticides sur le marché sont ceux produits à partir de *Bacillus thuringiensis* (Bt), une bactérie entomopathogène sporulante ayant pour principale caractéristique la production de protéines cristallines parasporales qui sont hautement toxiques pour certains insectes nuisibles et spécifiques dans leur activité (Morris, 1982). Depuis les 30 dernières années, plusieurs souches de Bt ont été découvertes et les sous-espèces les plus utilisées commercialement sont : Bt var. *kurstaki* (Btk) pour le contrôle des lépidoptères (ex.: TBE) ; Bt var. *azawai* pour le contrôle des lépidoptères et des diptères ; Bt var. *tenebrionis* pour le contrôle des coléoptères ; et Bt var. *israelensis* pour le contrôle des larves de diptères (ex.: les moustiques). Les innovations dans la formulation et les options d'application du produit ont amplifié l'intérêt de l'utilisation des insecticides microbiens. Bt occupe toujours 90-95% du marché des biopesticides microbiologiques, marché évalué à quelques centaines de millions de dollars (voir **Tableau 1**).

**Tableau 1** : Évaluation annuelle présente et future du marché des biopesticides. Le marché global des insecticides est évalué à plus de 8 milliards de dollars (Freitelson, 1992 ; Lisansky, 1997 ; Georgis, 1997).

Pesticides	Taille approximative des marchés (millions \$)		
	1980	1992	2000
biologiques	24	100	300
microbiologiques	24	70	140

La compétition avec les pesticides chimiques est difficile et la réduction du coût de production des biopesticides continue d'être un sujet de recherche fort populaire. La production en masse de Bt à des prix compétitifs sans réduire le potentiel entomopathogène est possible en utilisant des déchets solides locaux. Les boues d'épuration constituent un milieu intéressant pour atteindre cet objectif parce qu'elles sont disponibles partout dans le monde et que les frais liés à leur utilisation se limitent à leur transport. Il est estimé que les économies sont de plus de 50% (0,70\$/litre du milieu commercial contre 0,25-0,34\$/litre de boue). La possibilité de produire Bt à partir de boues d'épuration est étudiée par l'équipe de recherche du Dr R. D. Tyagi et du Dr J. R. Valéro avec des résultats encourageants : un produit contenant plus de  $5-7 \times 10^8$  cellules/ml de Bt avec un taux de sporulation de 60-70% et une entomotoxicité de plus de  $9,5 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l (unités

internationales / microlitre) a été obtenu sous des conditions non optimisées. Si le produit est optimisé, il lui est possible de rivaliser avec les préparations déjà commercialisées comme le Foray™ contenant plus de 90% de spores avec une entomotoxicité de  $12,6 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l. Ainsi, des recherches sont en cours pour déterminer les facteurs biotiques et abiotiques permettant un taux élevé de sporulation et une forte entomotoxicité. Dans ce travail, l'induction de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis* par des changements de température ou de pH au début ou durant la phase de sporulation et de production des entomotoxines est proposée pour maximiser la sporulation et l'entomotoxicité.

## 1.4 *Bacillus thuringiensis*

### 1.4.1 Caractéristiques générales

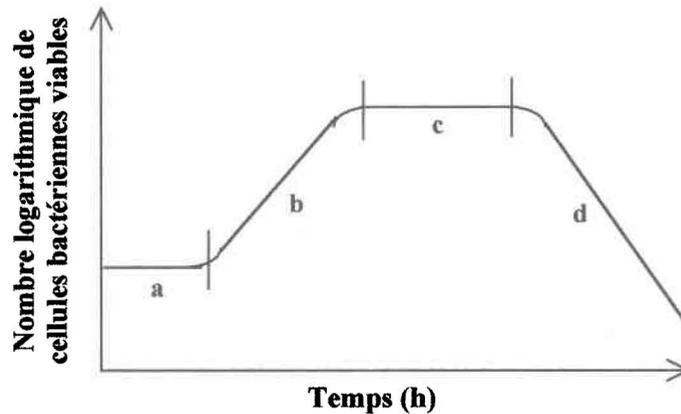
*Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie entomopathogène, chimioorganotrophe et aérobie. En forme de bâtonnet droit (0,5-2,5 x 1,2-10  $\mu$ m), cette bactérie Gram positif se présente habituellement en paire ou en chaîne et est mobile grâce à des flagelles péritriches. Sporulante, une cellule contient une seule spore ovale qui réfracte la lumière au microscope à fond clair. Sa température optimale de croissance est de 30°C et son pH optimal est tout près de la neutralité. Elle croît très bien dans des milieux de culture comme le bouillon tryptique soja (Tryptic soy broth, Difco). Sur les milieux de culture gélosés tryptique soja, Bt produit des colonies légèrement ondulées de forme ronde et de couleur blanche. Elle se distingue des autres bactéries du genre *Bacillus* par son pouvoir entomopathogène envers certains insectes (principalement ceux de l'ordre des lépidoptères comme les larves de la TBE) et par la production d'une ou plusieurs protéines cristallines parasporales en parallèle avec la formation de l'endospore (Sneath, 1984). Il existe 69 sérotypes de l'espèce *Bacillus thuringiensis* et chacun est caractérisé par son antigène flagellaire (Lecadet et al., 1999). Bt produit plusieurs toxines et la plus utilisée dans les formulations commerciales est la  $\delta$ -endotoxine (cristal protéique bipyramidal). La propriété de synthétiser les cristaux parasporaux est codée par un ou plusieurs plasmides et quelques variétés de Bt peuvent posséder jusqu'à 17 plasmides (Faust et al., 1983 ; Whiteley et Schnepf, 1986). Bt var *kurstaki* désignée HD-1 (Dulmage, 1970) est la plus populaire des sous-espèces de Bt et constitue toujours la base de la plupart des formulations commerciales d'insecticides utilisées en

agriculture et en foresterie (Frankenhuyzen, 1990). Dans le cadre du projet de bioconversion des boues en biopesticides, les bactéries utilisées sont **Bt var *kursaki* HD-1 (Btk)** et **Bt no.11 (Bt-11)**. Cette dernière est la onzième souche isolée des boues d'épuration par l'équipe de R.D. Tyagi et de J.R. Valéro et elle se développe 1,5 fois plus rapidement que Btk avec une toxicité deux fois plus élevée ( $15,8 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l) contre la TBE (résultats non publiés). L'étude de ses caractéristiques physiologiques et génétiques est en cours.

#### 1.4.2 Croissance et métabolisme

*Bacillus thuringiensis* tire son énergie de source chimique et utilise des glucides comme source de carbone. Durant la croissance végétative, Bt catabolise le glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, 93-100%) et par la voie des pentoses-phosphate (0-7%) (Lüthy et al., 1982). Le glucose est donc dégradé en pyruvate et en acétate. L'accumulation de ces acides organiques peut diminuer le pH du milieu jusqu'à une valeur de 5 durant la période de croissance végétative. Au moment où le pyruvate, l'acétate et les autres acides du milieu sont consommés, le pH du milieu revient vers la neutralité et peut augmenter jusqu'à une valeur de 8 à la dernière étape de la sporulation où la lyse de la cellule survient (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Norris, 1971 ; Rowe et Margaritis, 1987; Benoît et al., 1990 ; Morris et al., 1996). Bt assimile l'azote sous forme de  $\text{NH}_4^+$  durant la croissance végétative. Cet azote est mobilisé durant la sporulation pour synthétiser des métabolites secondaires comme les cristaux protéiques toxiques (Lüthy et al., 1982 ; Avignone-Rossa, 1995). Bt utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons pour oxyder en  $\text{CO}_2$  les métabolites issus de la fermentation (Sneath, 1984 ; Vadeboncoeur, 1997). Les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques oxydant les métabolites acides en  $\text{CO}_2$  ne subissent pas de répression lorsque la sporulation débute (Avignone-Rossa, 1995). Dans la section 1.4.3.2, les changements métaboliques survenant lors de la sporulation des spores sont expliqués plus en détail.

Dans le projet de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides, la production en masse de Bt se fait en système fermé ou discontinu (« batch culture ») où le milieu de culture n'est pas régénéré (Atlas et Bartha, 1994). Les étapes de la croissance bactérienne observées dans ce type de système sont schématisées dans la figure 1.



**Figure 1:** Courbe de croissance bactérienne typique en système fermé (Pelczar, 1993) : (a) phase de latence ; (b) phase exponentielle ; (c) phase stationnaire ; (d) phase de mortalité.

La phase de latence correspond à l'adaptation des cellules au nouvel environnement. Les cellules ne se divisent pas, mais elles sont physiologiquement actives en réparant les dommages cellulaires et en synthétisant des enzymes. La période d'adaptation est grandement influencée par la quantité d'inoculum, l'âge de la préculture et la composition du milieu (Wayman et Parekh, 1990). Une préculture jeune contenant environ  $1 \times 10^8$  cellules/ml et produite dans des conditions ne favorisant pas la sporulation est idéale pour minimiser le temps de latence après l'inoculation du milieu (Pearson et Ward, 1988). Durant la phase exponentielle de croissance, les cellules se divisent très rapidement et le taux de croissance est constant et maximal. Par définition, ce dernier correspond au nombre de fois que la population bactérienne double dans la culture et dépend de la température, du pH et de la composition du milieu (Pelczar, 1993). La formule pour calculer le taux de croissance est présentée dans la section 2.4. La phase stationnaire commence au moment où les nutriments du milieu s'épuisent. Des métabolites secondaires comme des toxines s'accumulent. Quelques cellules meurent alors que d'autres se divisent. La sporulation commence durant cette période (section 1.4.3.2). Le déclin des cellules viables s'observe durant la phase de mortalité où l'accumulation de produits métaboliques inhibiteurs et l'épuisement des nutriments essentiels entraînent la mort cellulaire (Pelczar, 1993).

Pour la production industrielle de Bt, la croissance et la production de toxines diffèrent beaucoup dans les milieux qui sont généralement complexes. Le plus performant pour la production en

masse de Bt est un milieu concentré en soja. D'autres, comme les boues d'épuration, allongent les phases de croissance. La production en masse de Bt s'effectue dans des bioréacteurs d'une capacité de milliers à des dizaines de milliers de litres qui offrent la possibilité de contrôler plusieurs paramètres expérimentaux comme la température, le pH, l'aération et l'agitation. Dans la production commerciale sous des conditions optimisées (Bernhard et Urz, 1993), les processus de production de Bt permettent généralement d'obtenir  $1-5 \times 10^9$  cellules/ml avec un haut taux de sporulation de 90% après 24-48 heures de fermentation (Smits, 1997).

### 1.4.3 Sporulation

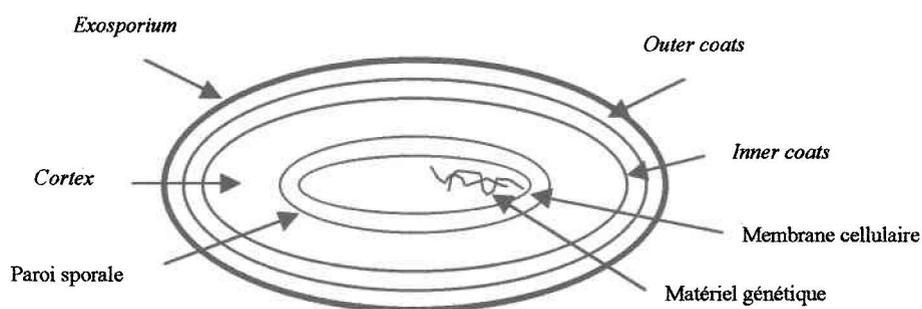
Quelques genres bactériens *Gram* + produisent des formes cellulaires dormantes appelées « spores » qui peuvent survivre dans des conditions de croissance défavorables comme la chaleur, l'absence d'éléments nutritifs et la dessiccation. Les genres sporulants les plus communs sont *Clostridium* et *Bacillus*. La structure de la spore est complexe et mérite une attention particulière pour bien comprendre les phénomènes de la sporulation et de la germination des spores.

#### 1.4.3.1 Structure de la spore

Les spores formées à l'intérieur de la cellule sont appelées "endospores" et sont uniques aux bactéries. Produites une par cellule, les endospores varient dans leur forme et leur location à l'intérieur de la cellule. Les spores sont brillantes sous microscope à fond clair et il est possible de les différencier des cellules végétatives au microscope en contraste de phase à cause de leur membrane épaisse et hautement réfractrice (Pelzcar, 1994). Elles sont hautement résistantes à la chaleur, à la dessiccation, au traitement ultrasonique et aux changements environnementaux. Le maintien de l'intégrité de l'ADN est nécessaire pour la survie des spores. Toute lésion dans la séquence ou la structure chimique de cet ADN comme celles provoquées par les rayons ultraviolets risque de compromettre la viabilité de la cellule avant et après la germination. Leurs facteurs de protection sont nombreux, notamment les multiples couches protéiques, la déshydratation et les protéines « small acid-soluble spore proteins » ou SASP (Pelmont, 1993b).

Les endospores contiennent de l'acide dipicolinique (DAP, pyridine-2 : acide 6-dicarboxylique), ce qui les différencie des exospores, des kystes et des conidies, trois autres formes de spores retrouvées chez certains genres bactériens (Pelmont, 1993a). Le DAP est absent chez les cellules

végétatives et il compte pour 5-15% de la masse sèche de l'endospore. Il est souvent en combinaison avec du calcium (Murrel, 1961 ; Pelzcar, 1993). Toutes les endospores sont recouvertes par l'*exosporium*, une mince membrane protéique (~37% d'acides aminés) constituée aussi de lipides (~18%), d'éléments non hydrolysables (~18%), de glucides (~10%), de glucosamine (~11%) et de phosphate inorganique (Gould, 1969). Sous l'*exosporium*, une ou plusieurs couches enveloppent (*spores coats*) le protoplaste, occupent 50% du volume de la spore et lui donnent sa résistance. Les couches (*outer coats* et *inner coats*) contiennent principalement des protéines, du phosphore (0-3%) et quelques lipides (Gould, 1969). La région sous ces couches est appelée le *cortex* où la majorité du DAP se situe (Murrell, 1969 ; Lundgren et Cooney, 1962). La paroi sporale se situe sous le *cortex*, mais elle a été très peu étudiée. Sous la paroi sporale, la membrane cellulaire (*cell wall*) recouvre la fraction soluble du spore contenant des enzymes, de l'ARN, de l'ADN, des inclusions membranaires et des mésosomes. On y retrouve aussi les protéines SASP qui sont liés à l'ADN bicaténaire pour y exercer un rôle stabilisateur encore peu étudié (Pelmont, 1993b). Cette dernière membrane est typique des cellules végétatives, mais elle est plus concentrée en molécules azotées. La membrane cellulaire et la fraction soluble occupent 30 % du volume de la spore (Gould, 1969).



**Figure 2** : Structure d'un endospore (Gould, 1969).

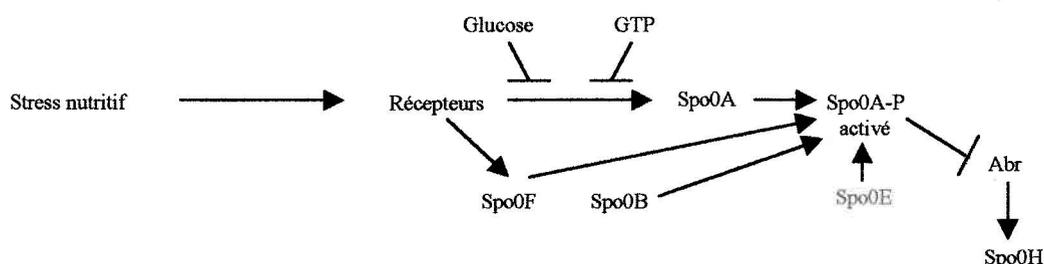
Le phosphore et le calcium sont les éléments inorganiques les plus importants contenus dans les diverses structures de la spore. Le phosphore occupe 7% de la masse sèche de la spore et le calcium, 2-3%. Le potassium, le magnésium et le manganèse sont les autres éléments inorganiques majeurs de la spore. Ces métaux servent de cofacteurs pour certaines réactions métaboliques actives durant la sporulation (Lundgren et Cooney, 1962). La quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  et de DAP est importante pour la stabilité de la spore : en combinaison dans la spore, ils sont

nécessaires au développement et à la résistance à la chaleur (Murrel, 1969 ; Pelzcar, 1993).  $Mn^{2+}$  et  $Zn^{+}$  participent aussi dans la stabilité de la spore en formant des complexes avec le DPA (Beskid et Lundgren, 1961 ; Lundgren et Cooney, 1962).

Ainsi, beaucoup d'éléments organiques et inorganiques sont exigés pour que la formation des éléments structuraux de la spore soit possible. Leur quantité dans le milieu a généralement pour effet d'augmenter le taux de sporulation et la qualité des spores. Avec la diversité et la quantité de leurs constituants, les boues d'épuration utilisées dans le cadre du projet de bioconversion des boues en biopesticides sont un milieu convenable pour la sporulation de Bt.

#### 1.4.3.2 Génétique de la sporulation

La sporulation exige un programme spécial qui demande pas moins de 80 gènes. La régulation génétique de la sporulation requiert l'interaction des produits protéiques de plusieurs gènes : Spo 0A, -B, -E, -F, -H, -J et -K, les gènes permettant la sporulation ; Abr B, Hpr et Sin, les gènes produisant des répresseurs de la sporulation. La composition en nutriments du milieu influence l'induction et la répression de tous ces gènes. Le plus important, Spo 0A, est activé lorsque le milieu est déficient en nutriments. La protéine produite et phosphorylée, en interaction avec les produits des gènes Spo 0B, Spo 0E et Spo 0F, empêche le produit du gène Abr B de réprimer la sporulation. La protéine Abr B se lie au gène Spo 0H, celui codant pour le facteur  $\sigma^H$ , un puissant effecteur de la sporulation essentiel pour ce processus (Smith, 1989). Les gènes Spo 0A et Spo 0H doivent être phosphorylés pour qu'il y ait sporulation. Ce sont les signaux de deux kinases (KinA et KinB) qui initient l'enchaînement de phosphorylations menant à l'activation de SpoOA suite à des conditions d'affaiblissement du milieu (Piggot et al., 1994). Les seules molécules organiques connues qui affectent l'activité de KinA sont les acides gras insaturés (Piggot et al., 1994). De hauts niveaux de guanosine triphosphate (GTP) et de glucose bloquent le procédé d'activation de Spo 0A, présenté à la **Figure 3**. Lors de la sporulation, une baisse de GTP est remarquée (Sonenshein, 1989). Le GTP est un corepresseur de la sporulation impliqué dans le signal pour l'initiation de la sporulation (Sonenshein, 1989 ; Smith, 1989 ; Starzak et Rakesh, 1991).



**Figure 3** : Génétique de la sporulation chez *Bacillus*, gènes principaux (Smith, 1989)

Une cascade de facteurs sigma ( $\sigma$ ) contrôle les événements de la sporulation (Starzak et Rakesh, 1991). Tous ces facteurs  $\sigma$  ont la même fonction qui est de reconnaître un promoteur et d'autoriser l'amorçage de la transcription par l'ARN-polymérase (Pelmont, 1993a). Plusieurs autres gènes participent au mécanisme. SpoIIIG produit le facteur d'amorçage  $\sigma$ G pour la transcription des gènes de la présore. SpoIIGB et SpoIVF (codant pour  $\sigma$ F) permettent l'expression du facteur d'amorçage  $\sigma$ E, le facteur qui permet de passer de l'étape 2 à l'étape 3 de la sporulation. Les gènes SpoIIIC, SpoIVC et -B produisent le facteur  $\sigma$ K nécessaire à l'expression des gènes *Cot* codant pour les protéines membranaires du spore. Pour le moment, la cascade des facteurs  $\sigma$  serait  $\sigma$ H $\rightarrow$  $\sigma$ F $\rightarrow$  $\sigma$ E $\rightarrow$  $\sigma$ G $\rightarrow$  $\sigma$ K (Pelmont, 1993a). Les chiffres retrouvés dans le terme descriptif des gènes correspondent à l'étape de la sporulation dans laquelle ils sont exprimés (ex.: le gène SpoIIIG est exprimé à l'étape 3). Ces étapes sont décrites dans la prochaine section (1.4.3.3).

Les informations sur la génétique de la sporulation indiquent que les cultures en système fermé sont idéales pour optimiser le processus de la sporogénèse. Une culture discontinue permet aux bactéries de consommer tous les nutriments et de réguler leur système génétique en faveur de la sporulation. Le projet de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides tient compte de ces considérations.

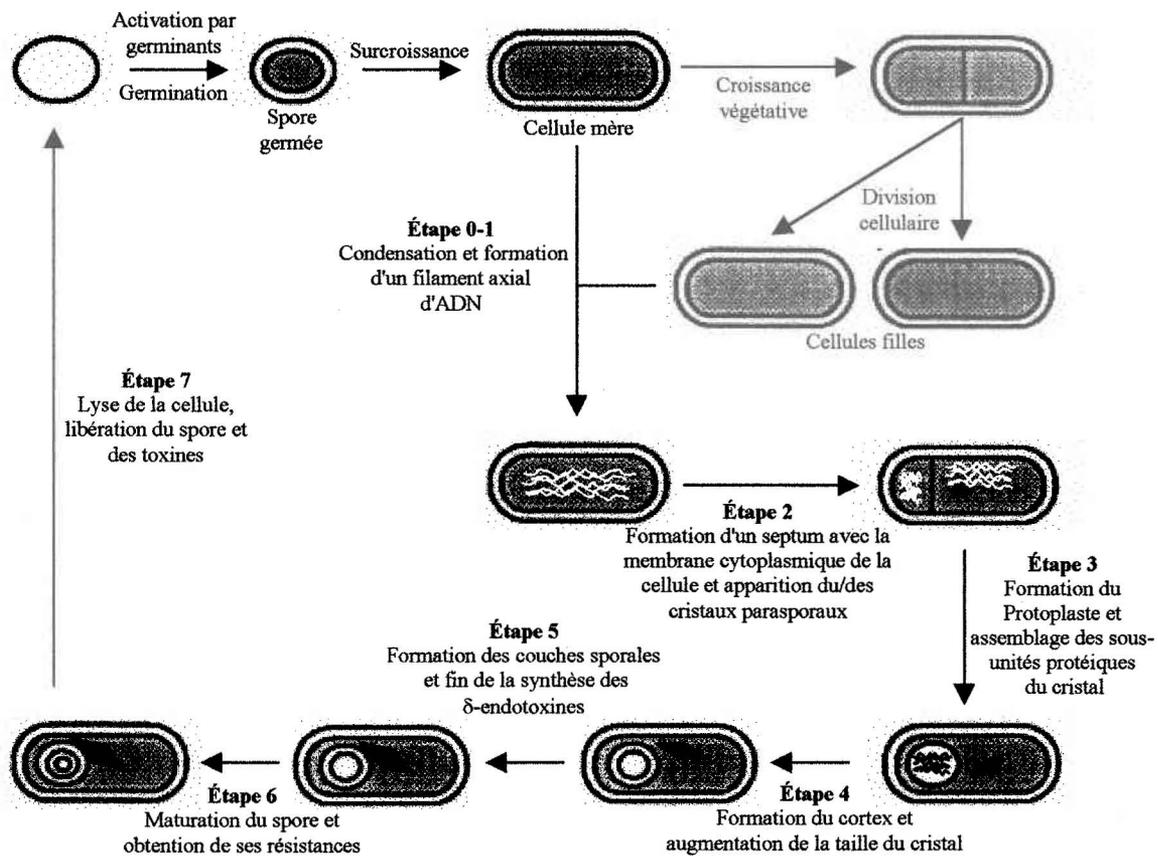
### 1.4.3.3 Formation des spores

Les changements morphologiques et physiologiques résultant en la formation ou en la germination d'endospores sont similaires pour toutes les espèces du genre *Bacillus*. La littérature à ce sujet concerne généralement l'ensemble des bactéries du genre *Bacillus*.

La formation de spores s'effectue en sept étapes (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Piggot et Coote, 1976 ; Bulla et al., 1980 ; Sneath, 1984 ; Slepecky et Hemphill, 1992 ; Piggot et al., 1994). Les bactéries végétatives en pleine croissance qui entrent peu à peu dans la phase stationnaire sont désignées par l'étape 0 et à l'intérieur de celles-ci, la chromatine condensée est suspendue à des inclusions membranaires comme les mésosomes. La synthèse de l'ADN se termine à l'étape I et un filament axial de chromatine est formé par la condensation de deux nucléotides supportés par les mésosomes. Un septum est formé par l'invagination de la membrane à l'une des extrémités de la cellule à l'étape II. L'étape III correspond à la formation du protoplaste, c'est-à-dire, une spore avec uniquement une membrane cytoplasmique, libre à l'intérieur de la cellule mère. La membrane cellulaire et le *cortex* sont produits autour du protoplaste sporal à l'étape IV. C'est à l'étape V que les couches sporales (*spore coats*) sont synthétisées. La maturation de la spore se fait à l'étape VI où il y a accroissement de sa réfringence et de sa résistance (chaleur, solvants inorganiques, etc.), déshydratation et accumulation du DPA et du  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalement, la cellule mère est lysée à l'étape VII et la spore mature est libérée (voir figure 2).

Plusieurs activités biochimiques interviennent dans ce processus. Par exemple, certaines permettent l'apparition de composants structuraux qui diffèrent de ceux des cellules végétatives comme le peptidoglycane du *cortex* et les protéines des couches sporales ; d'autres induisent l'augmentation de l'activité des enzymes du cycle tricarboxylique (TCA) pour maintenir adéquatement le niveau d'ATP lors des conditions limitées de la sporulation. Les facteurs biotiques et abiotiques influençant la sporulation sont discutés dans la section 1.4.3.3.

Les spores produites entrent dans un état de "dormance" caractérisé par une activité métabolique très basse qui empêche tout développement cellulaire. Une température et un pH stable, l'absence d'ions et une basse activité de l'eau sont des facteurs qui favorisent l'état de dormance (Gould, 1969).



**Figure 4 :** Schéma de la germination des spores, la croissance végétative, la sporulation et la production de toxines chez la bactérie entomopathogène *Bacillus thuringiensis* (Bulla et al., 1980 ; Slepecky et Hemphill, 1992 ; Piggot et al., 1994).

En somme, le changement de facteurs abiotiques, comme la température ou le pH pour augmenter la vitesse et le taux de sporulation, doit absolument être réalisé au début de la formation des spores. Lorsque les cellules ont sporulé et que la majorité des spores est libérée dans le milieu, de tels changements pourraient les activer et favoriser leur germination. Il est donc important de connaître le moment exacte où Bt commence à sporuler lors de la fermentation des boues d'épuration. La littérature n'est pas précise à ce sujet et ce travail comporte des expériences contrôles pour bien évaluer le début de la sporulation lors de la fermentation des boues (voir section 3.1). De plus, à la section 1.4.3.6, une attention particulière est portée sur la germination des spores afin de bien déterminer les causes de ce phénomène pour mieux le prévenir.

#### **1.4.3.4 Facteurs biotiques influençant la formation des spores**

Les événements physiologiques et biochimiques survenant durant la formation et la germination des spores sont bien entendu régulés, soit par induction ou par répression d'enzymes ou autres facteurs d'expression génétique. Une croissance végétative ne mène pas toujours à la formation de spore puisque la sporulation est grandement affectée par l'environnement extérieur de la cellule. Durant la sporulation bactérienne, le métabolisme de la cellule change considérablement. La croissance cesse pour plusieurs raisons et en général, les revirements métaboliques augmentent, les réserves s'accroissent et le cheminement du carbone prend une toute autre direction. Pour contrôler la sporulation, la connaissance des facteurs qui convertissent le métabolisme de la croissance végétative en un métabolisme sporulatoire est essentielle. Pour le projet de la bioconversion des déchets solides en biopesticides, la sporulation de toutes les bactéries est recherchée et la germination est à éviter. Une attention particulière est portée sur les facteurs influençant la sporulation. Les informations sur la sporulation et la germination retrouvées dans cette section s'appliquent à toutes les bactéries formant des endospores, tout particulièrement le genre *Bacillus*. La majorité des articles scientifiques consultés traite de *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. megatherium* et *B. thuringiensis*.

##### **1.4.3.4.1 Influence des molécules organiques**

En général, lorsque les sources de carbone et d'azote sont en quantités suffisantes dans le milieu, les bactéries du genre *Bacillus* croissent et la sporulation est réprimée : la réduction ou l'absence de l'une de ces deux sources permet la formation de spores (Piggot et Coote, 1976). La nature des nutriments carbonés et azotés est très importante et le rapport carbone-azote détermine à quel moment la sporulation débute (Murrell, 1961). La faible concentration ou l'absence d'une source de carbone rapidement métabolisable ou d'azote facilement disponible induit la sporulation (Smith, 1989). Bref, l'affaiblissement du milieu à la fin de la phase exponentielle de croissance induit l'initiation de la sporulation (Lüthy et al., 1982).

###### **1.4.3.4.1.1 Sources de carbone**

Lors de la période de sporulation, l'addition de nutriments peut interrompre le procédé de différenciation et ramener les conditions de croissance (Lüthy et al., 1982). L'addition de 0,1 à 0,2 % (v/v) de glucose induit la sporulation, mais la prévient si l'addition se fait avant que la

sporulation débute (Murrell, 1961). Le métabolisme du glucose est en compétition avec le métabolisme intracellulaire essentiel à la sporogénèse : la cellule accorde priorité au métabolisme du glucose en utilisant les éléments azotés et en réduisant l'activité enzymatique des autres voies métaboliques nécessaires à la sporulation (Halvorson, 1957 ; Hardwick et Foster, 1969 ; Piggot et Coote, 1976). Si une source supplémentaire d'azote est ajoutée avec du glucose, le phénomène de suppression par le glucose n'est pas observé (Hardwick et Foster, 1969). Ce phénomène suggère que tout processus métabolique réduisant les réserves azotées utilisées pour fournir les précurseurs des matériaux sporaux peut théoriquement inhiber la sporulation (Hardwick et Foster, 1969). D'autres sources de carbone rapidement métabolisables comme le malate et le pyruvate peuvent empêcher la sporulation en s'accumulant dans la cellule. Une baisse de leur concentration joue un rôle dans l'initiation de la sporulation.

Deux systèmes métaboliques deviennent fonctionnels durant la sporulation : le TCA et la formation / dégradation du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Les métabolites de ces deux systèmes sont utilisés comme matériaux sporaux ou transformés en CO<sub>2</sub> (Gould, 1969). De plus, le cycle TCA se charge de la production de l'ATP, molécule utilisée pour la répression (par phosphorylation ou adénylation) des répresseurs de la sporulation (Piggot et Coote, 1976). Le cycle du TCA est incomplet durant la sporulation (Lüthy et al., 1982 ; Avignone-Rossa et Mignone, 1995) et les enzymes qui fonctionnent produisent des composés utilisés pour la synthèse du DPA. Divers autres facteurs nutritifs peuvent affecter le taux de sporulation comme les acides gras, les facteurs de croissance ou des coenzymes (Murrell, 1961 ; Gould, 1969).

#### 1.4.3.4.1.2 Sources d'azote

Tel que mentionné précédemment, une faible concentration ou l'absence d'azote peut initier la sporulation et certains acides aminés ont plus d'influence que d'autres. Les réserves d'acides aminés, de purines et de pyrimidines diminuent durant le processus et il a été démontré que plusieurs de ces éléments sont incorporés dans la spore (Murrell, 1961). Le glutamate est important pour la sporulation et intervient dans le cycle TCA (Gould, 1969 ; Lüthy et al., 1982). Le glutamate sert de précurseur pour le DPA et de source de carbone et d'azote pour la synthèse d'acides aminés durant la sporulation (Gould, 1969). L'alanine ( $\beta$ -alanine et L-alanine) inhibe la sporulation lorsqu'elle est présente dans le milieu (Foster et Heiligman, 1949). Certains auteurs

rapportent que les milieux riches en protéines inhibent la sporulation (Pearson et Ward, 1988). D'autres auteurs affirment qu'une haute gamme d'acides aminés est utilisée durant la sporulation (Egorov et al., 1984 ; Morris et al., 1996 ). Peu d'études sont faites à ce sujet et la littérature est peu disponible.

#### **1.4.3.4.2 Influence des molécules inorganiques**

Le CO<sub>2</sub> stimule la sporulation. Une haute concentration de CO<sub>2</sub> n'augmente pas le taux de sporulation, mais rend le processus plus rapide et complet. Il est donc possible d'observer une sporulation rapide après une période de croissance vigoureuse où une forte quantité de CO<sub>2</sub> est produite (Powell et Hunter, 1955). Chez le genre bactérien *Bacillus*, le CO<sub>2</sub> a un effet stimulateur sur la synthèse du DAP lors de la sporulation (Powell, 1953 ; Powell et Hunter, 1955). Le CO<sub>2</sub> inhibe la décarboxylation de l'acide  $\alpha\epsilon$ -diaminopimelique (DAA), composé qui est déaminé et déshydrogéné pour devenir du DAP. De plus, le CO<sub>2</sub> permet la réaction de désamination du DAA. Conséquemment, la construction du DPA est plus rapide en présence d'une forte quantité de CO<sub>2</sub> (Powell et Hunter, 1955).

La sporulation est stimulée par des ions inorganiques, particulièrement Ca<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup>, qui constituent certaines structures sporales (Bernhard et Urz, 1993). En ajustant la concentration des ions Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>+</sup> et Zn<sup>+</sup> (complexés ou non complexés), il est possible d'améliorer la sporulation. Le Ca<sup>2+</sup> est le plus important ion déterminant la qualité des spores. En son absence, les spores n'ont pas une bonne résistance à la chaleur et leur DPA est déficient (Murrell, 1961 ; Gould, 1969 ; Levine, 1985). La sporulation est impossible dans un milieu sans Mn<sup>2+</sup> (Murrell, 1961) : ce cation est essentiel durant la sporulation de plusieurs *Bacillus* et joue probablement un rôle dans l'activation de quelque enzymes actives dans la formation des spores (Gould, 1969). Les chlorures tels que NaCl et KCl accélèrent légèrement le processus (2% v/v) chez le genre *Bacillus* (Murrell, 1961).

En somme, deux principaux facteurs externes sont habituellement considérés comme des inducteurs de la sporulation : la réduction du niveau des substrats qui sont nécessaires à la croissance et qui répriment la sporulation et l'accumulation de quelques métabolites (Gould, 1969). Plusieurs enzymes de la sporulation sont régulées par le mécanisme de la répression

catabolique du glucose. Ainsi, toutes les expériences de ce travail sont effectuées en culture discontinue (« batch culture ») pour s'assurer de l'épuisement complet des substrats de croissance sans qu'il y ait d'apports nutritifs supplémentaires susceptibles de ralentir la sporogénèse. Il a été aussi rapporté que différents cations et anions peuvent influencer la croissance, la sporulation et la qualité des spores chez le genre *Bacillus*. Un milieu de croissance comme les boues contient tous les éléments organiques et inorganiques susceptibles de stimuler la sporulation. Il faut toutefois s'assurer que les éléments nutritifs puissent être consommés rapidement en étant accessibles aux cellules bactériennes. Cela est pris en considération dans les expériences de ce travail : une comparaison est effectuée entre les boues mixtes et les boues secondaires utilisées comme substrats de fermentation afin de juger si la plus grande disponibilité de la matière organique dans les boues secondaires peut influencer le nombre de spores, le taux de sporulation et le niveau de toxicité.

#### **1.4.3.5 Facteurs abiotiques influençant la formation des spores**

Trois facteurs abiotiques importants peuvent influencer la formation de spores : le pH, la température et l'aération. Les effets du pH et de la température sur la sporulation n'ont pas encore fait l'objet d'études précises : la littérature traite surtout de l'effet des pH ou températures extrêmes (Edwards, 1990).

##### **1.4.3.5.1 Les effets du pH**

Le pH peut interrompre la sporulation des bactéries. Les limites du pH pour la sporulation sont généralement proches de celles exigées pour la croissance et sa valeur optimale est tout près de la neutralité (Murrell, 1961). Le pH affecte la dissociation de différents groupes fonctionnels des acides aminés des protéines et influence ainsi la conformation des enzymes et leur activité. De plus, le pH peut influencer la solubilité de plusieurs molécules comme l'ammonium, le phosphate, ce qui limite la croissance microbienne et peut mobiliser des métaux lourds comme le cuivre qui est toxique pour les microorganismes (Atlas et Bartha, 1993). La sporulation des bactéries est réduite à un pH supérieur à 7,6 (Halvorson, 1957), diminuée considérablement sous pH 6 et inhibée sous pH 5,5 (Salama et al., 1983 ; Morris et al., 1996). Finalement, la sporulation débute à la fin de la phase exponentielle de croissance au moment où le pH revient vers la neutralité et devient basique (voir section 1.4.2).

#### **1.4.3.5.2 Les effets de la température**

Comme pour le pH, les limites de la température pour la sporulation sont généralement proches de celles exigées pour la croissance (Murrell, 1961 ; Halvorson, 1957) qui s'effectue plus rapidement à 30°C. La température affecte le taux de sporulation et les propriétés des spores. Les hautes températures peuvent apporter des changements réversibles ou irréversibles dans la conformation des protéines. Pendant la sporulation, des changements d'une température à une autre diminuent la résistance à la chaleur et le nombre de spores formées (Gould, 1969). La température affecte le processus de la sporulation au niveau enzymatique (conformation structurale des protéines) et au niveau de l'expression des gènes nécessaires à la formation des spores (inactivation d'inducteurs par exemple) (Pelmont, 1993a et 1993b). Les spores formées à de hautes températures sont plus résistantes à la chaleur et leur contenu en DPA, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>+</sup> et Mn<sup>2+</sup> augmentent (Murrell, 1961 ; Lechowich et Ordal, 1962). En général, lorsqu'une température élevée ne tue pas les microorganismes, elle augmente leurs activités métaboliques. Une augmentation de température de 10°C à l'intérieur des limites de croissance double habituellement l'activité enzymatique (Atlas et Bartha, 1993). Cette notion suggère que le processus enzymatique de la sporulation peut être favorisé par une augmentation de température. De plus, des agents régulateurs qui identifient les promoteurs des gènes pour permettre leur transcription sont aussi formés lors des chocs thermiques. Ces éléments de réponse HSE (*heat shock response element*) favorisent la transcription des gènes, tout particulièrement les gènes de choc thermique (*heat shock genes*). Ce type de réponse à des chocs thermiques est commun à plusieurs organismes procaryotes et eucaryotes. La synthèse de certaines protéines peut être interrompue pour faire place à celle d'un nouvel ensemble de protéines chaperonnes (*heat shock proteins*) qui se complexent avec d'autres protéines afin de prévenir les déformations au niveau de leur conformation (Lewin, 1993). Le rôle des HSE ou des protéines thermiques sur les gènes de la sporulation est très peu discuté dans la littérature consultée.

#### **1.4.3.5.3 Les effets de l'agitation et de l'aération**

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène pour toutes les cellules ; un tel environnement est indispensable pour contrôler la sporulation. Contrairement aux bâtonnets du genre *Clostridium*, la sporulation des bâtonnets du genre *Bacillus* n'est pas réprimée par exposition à l'oxygène de l'air. Une faible oxygénation réduit le pourcentage de sporulation

(Halvorson, 1957 ; Ordal, 1957). Sous des conditions anaérobies, la croissance de Bt est lente et sa sporulation peut être inhibée (Entwistle et al., 1993). Un fort taux d'aération est nécessaire pour obtenir une sporulation optimale des bacilles aérobies. L'oxygène est nécessaire à la synthèse des précurseurs de la sporulation et, une fois les précurseurs produits, le processus de sporulation peut se faire avec une faible aération (Roth et al., 1955 ; Murrell, 1961). La littérature suggère que la croissance et la sporulation peuvent être maximisées par de hauts niveaux d'aération à des températures variant entre 28 et 32°C (Dulmage, 1981 ; Lüthy et al., 1982 ; Pearson et Ward, 1988). Quelques expériences ont été effectuées sur l'influence de l'agitation par Montiel (1997). Des agitations de 300 et 350 rpm sont favorables à la croissance et à la sporulation de Bt.

En somme, l'optimisation du procédé de bioconversion des boues en biopesticides est possible avec des changements brusques de pH ou de température à la bonne agitation et aux débits d'air idéaux. Les valeurs modifiées de pH et de la température durant la fermentation ne doivent pas s'éloigner de celles qui favorisent la croissance et la sporulation optimales de Bt. Les pH et les températures extrêmes sont à éviter. De plus, la modification de ces facteurs abiotiques peut entraîner les spores à germer, phénomène qu'il faut éviter pour atteindre la sporulation maximale de Bt. Il est donc important d'en savoir plus sur le phénomène de la germination des spores.

#### **1.4.3.6 Germination des spores**

La transformation des endospores dormantes en cellules végétatives se fait en trois événements séquentiels, soit l'activation, la germination et la "surcroissance". L'activation est un traitement qui sort l'endospore de sa dormance et la prépare à germer. La spore activée retient la plupart de ses propriétés (résistance à la chaleur et à la radiation, réfractibilité) et l'activation peut être réversible (Gould, 1969). Une perte de couches sporales, de DPA et de  $Zn^{2+}$ , accompagnée d'un accroissement de la fluidité membranaire sont des phénomènes observés lors de l'activation.

La germination convertit la spore dormante activée en un état sensible métaboliquement actif (Sneath, 1984). Cette transition peut durer moins d'une minute. Les principaux changements qui surviennent lors de la germination sont la dépolymérisation et l'excrétion des constituants sporaux accompagnés d'une perte de la réfraction, de la résistance à la chaleur, à la radiation, à la

dessiccation et aux divers composés chimiques (Sneath, 1984 ; Gould, 1969). Durant la germination, la spore excrète des constituants structuraux, jusqu'à 30% de sa masse sèche. Les exudats sont constitués de  $\text{Ca}^{2+}$ , de DAP et de mureine dépolymérisée. La spore s'hydrate et augmente de volume (Gould, 1969). L'émergence de la cellule végétative détruit alors les couches sporales et dissout le cortex (Gould, 1969).

La "surcroissance" est définie comme étant le développement d'une cellule végétative à partir d'une endospore germée. Cette phase survient au moment où la nouvelle cellule végétative prend du volume en se libérant de son cortex et de ses couches sporales. Après son émergence, elle s'allonge et se divise (Gould, 1969 ; Sneath, 1984).

Contrairement aux facteurs abiotiques influençant la sporulation, la littérature est plus précise sur ceux influençant la germination. La germination peut être initiée par certains acides aminés, ribosides et sucres. La combinaison de ces facteurs permet une germination rapide et souvent complète. Les facteurs environnementaux nécessaires à l'optimisation de la germination comme la température, le pH, l'activité de l'eau ( $A_w$ ) et la force ionique du milieu varient beaucoup et diffèrent selon les espèces (Gould, 1969 ; Sneath, 1984). Habituellement, une courte exposition à la chaleur active les spores dormantes (Slepecky et Hemphill, 1992). Un pH bas et des agents réducteurs peuvent permettre l'activation des spores dormantes (Slepecky et Hemphill, 1992). La "surcroissance" survient uniquement lorsque le milieu peut supporter la croissance des cellules. Le germinant nutritif le plus commun est la L-alanine (Murrell, 1961 ; Foster et Johnstone, 1969). Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont habituellement nécessaires pour l'induction de la germination par la L-alanine. Parmi les germinants non nutritifs se trouvent les surfactants et le dipicolinate de calcium, mais les mécanismes qui causent la germination restent à élucider. Les pH extrêmes permettent l'activation des spores (Foster et Johnstone, 1969). Le taux de germination est affecté par la chaleur. L'activation par la chaleur ne mène pas spontanément à la germination, mais libère des stimulants endogènes et altère les structures de certains enzymes. De plus, elle peut empêcher les inhibiteurs de la germination de fonctionner ou modifier la perméabilité de la spore. À de basses températures, le taux de germination est lent et prolongé. Un traitement à la chaleur permet l'activation des spores en causant la perte des protéines des couches sporales et des changements dans leur structure (Foster et Johnstone, 1989). De plus, le relâchement de petites

quantités de DPA et de  $Zn^{+}$ , situées dans les couches et le centre de la spore, est observé (Murrell, 1961).

Ainsi, pour atteindre la sporulation maximale de Bt, la germination de ses spores est à éviter. Les boues sont un milieu où les éléments nutritifs deviennent de plus en plus accessibles durant la fermentation à cause du brassage et de l'activité microbienne. Des germinants peuvent être libérés et les spores peuvent germer. Une attention particulière doit donc être portée sur la qualité des boues afin qu'elles n'aient pas de haute concentration en germinants comme ceux énumérés précédemment.

En résumé, il faut noter que les facteurs biotiques et abiotiques n'influencent pas seulement la sporulation ou la germination, mais aussi la production de toxines. Les chocs de pH et de température pour l'optimisation de la sporulation doivent donner un niveau de production de toxines équivalent ou meilleur à celui des préparations commerciales de Bt. Il est donc important de connaître les facteurs pouvant influencer l'entomotoxicité.

#### 1.4.4 Entomotoxicité

Une bactérie entomopathogène produit des toxines insecticides. Les espèces bactériennes majeures de ces pathogènes possédant les facultés d'infecter et de tuer les insectes sont les bâtonnets sporulants. Pour ces espèces, le système digestif des larves d'insectes est un excellent environnement pour la prolifération bactérienne et, parfois, pour la sporulation.

*Bacillus thuringiensis* produit divers types de toxines (Whiteley et Schnepf, 1986) : la  $\alpha$ -exotoxine ; la  $\beta$ -exotoxine ; la  $\gamma$ -exotoxine ; la  $\delta$ -endotoxine ; des protéinases, lécithinases et nucléases. Les endotoxines et les exotoxines sont les deux principaux groupes de toxines qui se distinguent par leur emplacement par rapport à la cellule : les endotoxines correspondent aux toxines produites à l'intérieur de la cellule, en contraste avec les exotoxines qui sont excrétées à l'extérieur de la cellule lors de la croissance bactérienne (Lysenko et Kucera, 1971). Les toxines du type  $\delta$ -endotoxine sont les plus documentées et suscitent toujours un fort intérêt dans le domaine des biopesticides (Bond et Boycer, 1971 ; Lysenko et Kucera, 1971 ; Sebesta et al., 1981 ; Faust et Bulla, 1982 ; Lüthy et al., 1985 ; Cooper, 1994).

#### 1.4.4.1 Les $\delta$ -endotoxines et leur mode d'action

Les  $\delta$ -endotoxines constituent le groupe le plus important de toxines. La forme, la composition et le nombre d'endotoxines varient selon les sous-espèces de Bt (Aronson et al., 1986 ; Sarjeet et al., 1992). Les  $\delta$ -endotoxines sont toxiques pour une variété très étendue de lépidoptères et quelques larves de diptères et de coléoptères (Bulla et al., 1980 ; Lysenko et Kucera, 1971). Ces toxines sont synthétisées durant la sporulation et apparaissent comme des inclusions cristallines protéiques. Elles ont généralement une forme bipyramidale et réfractent la lumière au microscope à contraste de phase (Bulla et al., 1980). Les inclusions peuvent constituer jusqu'à 20-30% de la masse sèche des cellules sporulées (Lereclus et al., 1989). Des ponts hydrogène et disulfure permettent aux protéines de s'assembler dans l'inclusion parasporale (Sarjeet et al., 1992). Ces protéines cristallines sont des glycoprotéines de 130 à 160 kilodaltons (Bulla et al., 1977) et doivent être protéolysées en fragments de 30-80 kilodaltons pour devenir toxique (Whiteley et Schnepf, 1986). La solubilisation et l'activation des protoxines s'effectuent dans l'environnement alcalin du système intestinal des insectes susceptibles (Cooper, 1994). Les toxines activées causent la lyse des cellules épithéliales et entraînent la paralysie du système intestinal de l'hôte qui ne peut plus se nourrir et meurt (Sarjeet et al., 1992 ; Cooper, 1994). Sur la surface des cellules des lépidoptères, une molécule avec l'acétylgalactosamine comme résidu terminal est le récepteur de la toxine (Lereclus et al., 1989 ; Ellar, 1997). Après le contact des toxines avec les récepteurs, la perméabilité des cellules épithéliales est altérée et l'équilibre osmotique est perturbée par la formation de petits pores (Lüthy et al., 1985 ; Höfte et Whiteley, 1989 ; Sarjeet et al., 1992 ; Bravo et al., 1993 ; Cooper, 1994 ; Ellar, 1997).

Des études ont montré que les gènes structuraux codant pour les différentes endotoxines sont situés sur plusieurs plasmides de haut poids moléculaire, ces derniers étant associés avec des éléments transposables (Aronson et al., 1986). Les gènes des protéines cristallines codés sur des plasmides sont donc transmissibles à d'autres bactéries par des méthodes biotechnologiques (Whiteley et Schnepf, 1986). Le nombre de gènes codant pour les toxines dans les souches varient de 1 à 5 (Lereclus et al., 1989). Les  $\delta$ -endotoxines sont codées par différents gènes, groupés en cinq classes majeures : *cryI*, *cryII*, *cryIII*, *cryIV* et *cyt*. Les classes I et IV sont divisées en 4 sous-sections, soit A, B, C et D. Chaque sous-espèce de Bt a un ou plusieurs de ces gènes. Le tableau 2 classe les gènes des endotoxines.

**Tableau 2:** Gènes codant pour des endotoxines (Lereclus et al., 1989 ; Cooper, 1994 ; Höfte et Whiteley, 1989 ; Sarjeet et al., 1992) . Jusqu'à maintenant, plus de 42 gènes codant pour des  $\delta$ -endotoxines ont été caractérisés (Ellar, 1997). Ce tableau ne contient que les gènes les plus documentés.

Classe	Gène		Toxicité
	Sous-classe		
cryI	A, B, C, D		Larves de lépidoptères
cryII	A, B		Larves de lépidoptères et de diptères
cryIII	A, B		Larves de coléoptères
cryIV	A, B, C, D		Larves de diptères
cyt	A		En synergie avec d'autres composants des cristaux, le produit de ce gène devient plus toxique envers les diptères

La bactérie à l'étude, soit *B. thuringiensis* var. *kurstaki* K-1 ou HD-1, possède 3 gènes *cryIA* et 2 gènes *cryIIA* (Sarjeet et al., 1992). Le terme K-1 signifie le cristal qui la caractérise et qui contient deux toxines distinctes : une protoxine majeure ( $\delta$ -endotoxine ou P1) et une toxine mineure (P2). La  $\delta$ -endotoxine du cristal K-1 a une forme bipyramidale avec des striations proéminentes à la surface et le tout, formé par des sous-unités protéiques « dumb-bell-shaped » constitue 70-90% de K-1 (Norris, 1971 ; Aronson et al., 1986). Elle est dit « protoxine » parce qu'elle doit subir une transformation avant de devenir toxique. Pour l'autre bactérie à l'étude, soit Bt-11, les études génétiques sont encore incomplètes.

#### 1.4.4.2 La formation des cristaux protéiques

La synthèse de la protéine parasporale commence aux étapes II et III de la sporulation et les inclusions atteignent leur grandeur maximale à l'étape V (Fast, 1981 ; Aronson et al., 1986). Huber et Lüthy, 1987). Le cristal qui en résulte compte pour 20-30% des protéines totales du sporange (Lecadet et Dedonder, 1971 ; Aronson et al., 1986). La figure 3 illustre en partie la formation de la protéine cristalline lors des étapes de la sporulation (Bulla et al., 1980 ; Fast, 1981 ; Faust et Bulla, 1982).

#### 1.4.4.3 Facteurs biotiques et abiotiques influençant l'entomotoxicité

La littérature contient peu d'information sur les facteurs influençant le pouvoir entomopathogène de Btk. Les articles scientifiques consultés traitent surtout de *Bt israelensis* et *Bt aizawai*. Dans le cadre de ce travail, il est essentiel de tenir compte de la toxicité et des facteurs l'influençant, puisque les changements de température et de pH pour maximiser la sporulation ne doivent pas diminuer la production d'entomotoxines.

Les extrêmes de pH (<2 et >11) inactivent les cristaux (Cooksey, 1971 ; Nishitsutsuji-Uwo, 1977). L'activité des protéines cristallines reste intacte à des températures plus faibles que 75°C lorsque le pH de la culture bactérienne se situe entre 6-9 (Nishitsutsuji-Uwo, 1977). Les températures et les pH extrêmes brisent la structure tertiaire des protéines, conformation importante pour leur activité insecticide (Huber et Lüthy, 1987). La taille de l'inoculum n'a pas d'effet sur la production de toxines. La production de toxines est grandement affectée par la température de fermentation. Un pH entre 6,5-7,5 n'affecte pas la production de toxine. Un pH 8 maintenu durant une fermentation modifie la croissance bactérienne, la sporulation et par conséquent, la production de toxines. Faust et Bulla (1982) affirment que l'accumulation des toxines peut être affectée par le pH final du milieu. Un pH contrôlé à 7 favorise la production de la  $\delta$ -endotoxine (Sikdar et al., 1991). Un taux d'aération et une agitation trop élevés peuvent nuire à la production de toxines. Une faible agitation réduit la production de toxines. Une agitation entre 200-300 rpm et un taux d'aération ne dépassant pas 0,62 vvm sont recommandés (Abdel-Hammed et al., 1991). Le mécanisme de synthèse des toxines est affecté sous des conditions limitantes d'oxygène (Avignone-Rossa et Mignone, 1992). Les changements brusques de facteurs abiotiques, tels que prévus dans ce travail (voir section 2.5), sont décidés en fonction de l'information soutirée de la littérature. La majorité des fermentations sont effectuées sous pH 7 contrôlé à une agitation entre 200-300 rpm. L'addition d'acide inorganique pour maintenir le pH à la neutralité dans les dernières étapes de la croissance favorise la production de toxines. L'addition d'acide organique peut ralentir le processus de la sporulation en devenant une source de carbone supplémentaire pour la bactérie. Par conséquent, le contrôle du pH lors des fermentations est effectué avec une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La toxicité est reliée à la sporulation, mais la relation est encore mal définie. Les Bt mutants (spo-) ne peuvent pas produire de cristaux protéiques, cela indique que la synthèse des cristaux requiert les facteurs contrôlant la sporulation (Whiteley et Schnepf, 1986). L'expression des gènes des protéines cristallines chez Bt dépend de la transcription par une ou plusieurs ARN polymérase et est probablement influencée par un mécanisme régulateur de la sporulation non identifié ou encore par des facteurs codés sur des plasmides (Whiteley et Schnepf, 1986). Cela suggère que plusieurs autres facteurs régulant la sporulation sont requis pour la synthèse des cristaux. La littérature est confuse sur la relation entre le nombre de spores et celui des endotoxines : certains auteurs affirment que le nombre d'endotoxines augmente avec le nombre de spores alors que d'autres observent le contraire. Il se peut que le système enzymatique de Bt favorise la sporulation au détriment de la production de toxines, les facteurs nécessaires pour la sporulation et la production de toxines étant principalement utilisés pour former les spores. Ainsi, un changement brusque d'un facteur abiotique qui augmente le nombre de spores peut diminuer la toxicité. De plus, la production de spores et de toxines accompagne celle d'autres métabolites secondaires comme les protéases qui peuvent briser les cristaux et diminuer la toxicité (communication personnelle). Des expériences sont réalisées par l'équipe de R. D. Tyagi et J. R. Valéro pour mieux décrire la relation entre l'entomotoxicité de Bt et le nombre de spores formées.

Comme il a été dit précédemment (section 1.4.2), la composition du milieu de culture et les opérations faites avec les bioréacteurs affectent l'entomotoxicité de Bt. Les facteurs de croissance influençant la sporulation peuvent limiter la production des protéines cristallines. Les facteurs biotiques influencent beaucoup la sporulation et, par conséquent, la toxicité. Comme les spores, les endotoxines ont des constituants moléculaires tirés du milieu de croissance et leur niveau de concentration dans le milieu influencent leur production. D'autres éléments dans le milieu améliorent les propriétés cellulaires pour augmenter la production de métabolites secondaires comme les endotoxines. Par exemple, l'addition de NaCl et de Tween 80 augmente le potentiel entomotoxique de Bt. Le NaCl augmente la solubilité et la disponibilité de plusieurs protéines nécessaires à la construction des sous-unités de l'endotoxine. Il en est de même pour le détergent Tween 80 qui accentue le passage des composés dans les cellules bactériennes et rend les protéines plus solubles dans le milieu, donc plus disponibles pour la bactérie (Morris et al., 1996). Les acides aminés ont aussi une influence sur la production de toxines. La cystéine est considérée

comme un facteur obligatoire pour Bt, puisqu'elle régule les protéines membranaires et la synthèse de lipides, mais à certaines concentrations, les cultures peuvent avoir une faible toxicité (Bulla et al., 1980 ; Morris et al., 1996). L'arginine et l'acide glutamique sont importants dans la production des protéines endotoxines et plus de 455 résidus d'acides aminés les constituent (Morris et al., 1996). Finalement, certains ions comme  $\text{Ca}^{2+}$  sont essentiels pour la production de la  $\delta$ -endotoxine et certains métaux comme Mo peuvent avoir un effet inhibiteur sur sa production (Sikdar et al., 1991). Ainsi, des boues d'épuration avec une plus forte proportion d'azote disponible peuvent constituer le milieu idéal pour obtenir un excellent taux de sporulation avec un nombre optimal d'endotoxines.

La toxicité est mesurée par des bioessais standardisés (voir section 2.4) et elle est généralement exprimée en unités internationales par microlitre (UI /  $\mu\text{l}$ ). En industrie, la toxicité des suspensions de Bt est de  $1,6-2,1 \times 10^3$  UI /  $\mu\text{l}$  et une fois concentrées, elle peut atteindre  $12,6-16,9 \times 10^3$  UI /  $\mu\text{l}$ . Dans les boues d'épuration, la fermentation permet d'obtenir une toxicité de  $9,5 \times 10^3$  UI /  $\mu\text{l}$  et peut atteindre jusqu'à  $19 \times 10^3$  UI /  $\mu\text{l}$  si elles sont concentrées (résultats non publiés).

## 1.5 Hypothèse de travail

Avec environ 60-70% de spores et une entomotoxicité de  $9,5 \times 10^3$  UI/ $\mu\text{l}$ , les suspensions de Bt produites dans les boues d'épuration ne peuvent toujours pas rivaliser avec les préparations commerciales contenant plus de 90% de spores avec une entomotoxicité de  $12,6 \times 10^3$  UI/ $\mu\text{l}$ . De plus, la réduction du temps de fermentation doit être envisagée afin de diminuer le coût de production global. Le procédé de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides nécessite donc une optimisation avant son application industrielle. L'une des étapes du projet consiste à atteindre un taux élevé de sporulation (90%) afin d'avoir un produit plus entomotoxique et plus stable lors de sa conservation. Pour y parvenir, l'application de chocs thermiques et de pH pour induire la sporulation chez Bt est proposée. Cependant, la littérature est peu précise sur l'influence de ces facteurs abiotiques et discute surtout des limites pour la croissance et la sporulation de Bt. Il est possible que Bt réagisse à des changements de pH entre 6 et 8 ou de températures entre 35 et 40°C durant une fermentation initiée à un pH de 7 et une température de

30°C. Les systèmes enzymatiques à l'oeuvre dans la formation de spores ou la production des métabolites secondaires comme les endotoxines ne sont pas affectés à de telles valeurs et peuvent se prolonger pour une plus forte production. La réduction du temps de fermentation peut être envisageable. Le rendement maximal du produit peut donc s'obtenir en changeant la température et le pH au début ou durant la phase de sporulation et de production des entomotoxines.

## 1.6 Objectifs de recherche

Le but de ce travail est l'obtention d'un taux de sporulation de 90% par induction avec des variations brusques de facteurs abiotiques tout en conservant une toxicité de  $9,5 \times 10^3$  UI /  $\mu$ l ou plus. La température et le pH seront brusquement modifiés au début ou durant la phase de sporulation afin d'observer si Bt réagit à de tels chocs en sporulant plus rapidement et plus abondamment. Deux types de boues d'épuration (mixtes et secondaires) et deux souches bactériennes (Btk et Bt-11) seront à l'étude. Des taux élevés de sporulation et de fortes entomotoxicités seront sélectionnées dans plusieurs séries d'expériences en erlenmeyers. Les meilleures conditions déterminées en erlenmeyers seront reproduites en bioréacteur de 15 L où le contrôle continu des paramètres abiotiques est possible. Pour maximiser la sporulation et la production d'endotoxines de Btk ou Bt-11, les objectifs spécifiques de ce travail sont les suivants:

- déterminer la cinétique de croissance de Btk et de Bt-11 dans des boues mixtes et secondaires pour déterminer à quel moment les chocs thermiques ou de pH doivent être appliqués ;
- induire la sporulation chez Btk et Bt-11 avec la modification brusque de facteurs abiotiques tels que la température et le pH pour obtenir une suspension avec 90% de spores ;
- évaluer en bioréacteur (15 L) les meilleurs résultats obtenus dans les expériences préliminaires en erlenmeyers pour un meilleur contrôle de la température et du pH lors de leur modification ;
- atteindre le nombre maximal de spores en un temps minimum et réduire le temps de fermentation nécessaire pour obtenir un produit avec les caractéristiques désirées ;
- conserver une bonne entomotoxicité de la suspension.

Les changements brusques de pH se font à des valeurs entre 6 et 8 : les résultats de ce travail permettront de confirmer ou d'infirmier les énoncés de la littérature en question (section 1.4.3.5.1). Des températures de 35 et 40°C ont été choisies. La littérature mentionne que ces deux températures ne sont pas favorables pour la croissance, mais peuvent induire les systèmes enzymatiques comme celui de la sporulation (section 1.4.3.5.2). Les résultats permettront de juger s'il est acceptable de favoriser la sporulation au détriment de la croissance en autant que le niveau de toxicité soit satisfaisant. Selon la littérature, les changements proposés n'affectent pas la production d'entomotoxines et les résultats permettront d'éclaircir la relation entre le nombre de spores formées, le taux de sporulation et l'entomotoxicité du produit.

En somme, ce travail sert à optimiser le procédé de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides pour une éventuelle commercialisation. De plus, le contenu de ce mémoire propose des résultats précis et plus concrets sur l'influence du pH et de la température dans le processus de la sporulation.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Boues d'épuration

Les boues d'épuration proviennent de la décantation primaire et secondaire des eaux usées d'une usine de traitement d'eaux municipales (CUQ, Québec). Les boues primaires et secondaires sont recueillies après leur épaissement dans quatre épaisseurs gravitationnels pour donner des boues dites « mixtes ». À cette étape, la proportion de matières solides dans les boues passe de 1% à 5%. Les boues secondaires sont les résidus d'un procédé de biofiltration. Le tableau 3 donne les caractéristiques générales de ces boues.

**Tableau 3:** Caractéristiques physico-chimiques des boues mixtes et secondaires de la CUQ.

Paramètres	Type de boues - date d'échantillonnage			
	Mixtes <sup>1</sup> - 07/05/99		Secondaires <sup>2</sup>	
	non diluées	diluées	25/06/99	23/07/99
ST(g/l)	42,0	27,3	29,0	32,0
SVT (g/l)	36,5	23,7	20,0	22,0
MES (g/l)	38,5	25	24,0	27,0
MVES (g/l)	36,2	23,5	18,5	20,8
C <sub>t</sub> (mg/kg)	381780	247909	459925	383020
N <sub>t</sub> (mg/kg)	27825	28623	44080	55920
P <sub>t</sub> (mg/kg)	13507	8771	20846	11271
N-NH <sub>3</sub> (mg/kg)	501	325	793	1007
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	11	7	17	21
P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/kg)	8131	5280	12549	6785
Al <sup>3+</sup> (mg/kg)	14243	9249	12918	6671
Ca <sup>2+</sup> (mg/kg)	27544	17886	18859	16127
Cd (mg/kg)	0,9	0,6	0,9	0,7
Cr (mg/kg)	168	109	128	37
Cu <sup>+</sup> (mg/kg)	294	191	297	190
Fe (mg/kg)	16352	10618	15050	12201
K <sup>+</sup> (mg/kg)	2723	1768	3856	2072
Pb (mg/kg)	55	36	31	38
S (mg/kg)	6012	3903	7685	5791
Zn <sup>+</sup> (mg/kg)	768	499	386	314
Na <sup>+</sup> (mg/kg)	3163	2054	4806	1536

<sup>1</sup> Les boues mixtes ont été diluées pour obtenir 25 g/l de matières en suspension, concentration idéale pour la fermentation des boues d'épuration par *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (résultats non publiés).

<sup>2</sup> Durant leur échantillonnage, les boues secondaires ont été décantées et seulement la partie concentrée a été recueillie pour obtenir plus de matières en suspension (environ 25 g/l).

Les solides totaux (ST), les solides volatils totaux (SVT), les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspension (MVES) sont déterminés au laboratoire selon les méthodes standards pour l'analyse de l'eau (APHA et al., 1989). Avant leur analyse, toutes les boues sont digérées complètement selon la méthode de digestion des boues d'épuration accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989). Les données pour la concentration du phosphore total ( $P_t$ ) et des métaux sont obtenues après analyse au spectromètre à émission de plasma (« Inductively Coupled Plasma » ou ICP) selon la méthode approuvée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1989). Le carbone et l'azote total ( $C_t$  et  $N_t$ ) sont déterminés à l'aide d'un analyseur d'azote-carbone-soufre (« nitrogen-carbon-sulfur analyser » ou NCS) selon la méthode d'analyse du carbone total dans les sédiments (applicable aux boues d'épuration) accréditée par le gouvernement du Québec (MENVIQ, 1986). Les concentrations en  $N-NH_3$ ,  $N-NO_2^-NO_3^-$  et  $P-PO_4^{3-}$  proviennent des registres analytiques de la station d'épuration de la Communauté Urbaine du Québec (CUQ, 1999).

## 2.2 Souches bactériennes

Les microorganismes employés sont *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 appelée « Btk » et *Bacillus thuringiensis* no.11 (bactérie à l'étude isolée dans les boues municipales) appelée « Bt-11 » et proviennent de la collection du Centre de foresterie des Laurentides (Sainte-Foy, Québec). Les milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'enrichissement bactérien sont autoclavés à 121°C pendant 15 minutes après que leur pH soit ajusté à 7. Les bactéries sont cultivées sur une gélose tryptique soja contenant 3% de bouillon tryptique soja (Difco) et 1,5% de bacto-agar (Difco) qui est incubée dans une étuve Imperial II Incubator (Lab-Line) à une température de 30°C pendant 16 heures. Les souches bactériennes sont conservées à 4°C sur une gélose tryptique soja. Les colonies et les suspensions bactériennes sont observées en contraste de phase (X1000) avec un microscope Nikon. Les inocula sont préparés dans un erlenmeyer de 500mL (Pyrex®) contenant 100 ml de bouillon tryptique soja, préalablement repiqué avec une colonie bactérienne cultivée sur une gélose tryptique soja. Après 8-10 h d'incubation à une température de 30°C et une agitation de 200 rpm dans un incubateur Environ-Shaker (Lab-Line), les cultures contiennent environ  $1 \times 10^8$  cellules par ml. Afin de réduire le temps d'adaptation des bactéries dans les boues d'épuration, une préculture est préparée avec 2 ml (2% v/v) d'une culture réalisée en TSB déposés dans un erlenmeyer de 500ml (Pyrex®) contenant 100 ml de boues mixtes ou

secondaires. Avant leur inoculation, les boues sont stérilisées à l'autoclave Labo Autoclave (Sanyo) à 121°C pendant 20 minutes. Après 10-12 h d'incubation à une température de 30°C et une agitation de 200 rpm dans un incubateur Environ-Shaker (Lab-Line), les précultures contiennent environ  $1 \times 10^8$  cellules par ml. Pour les expériences préliminaires réalisées en erlenmeyers, 2 ml d'une préculture sont généralement utilisés pour ensemençer 100 ml de boues d'épuration stérilisées (2% v/v). Finalement, deux précultures de 100 ml sont généralement utilisées pour inoculer le bioréacteur (2% v/v) contenant les boues d'épuration.

## **2.3 Fermentation**

### **2.3.1 Expériences préliminaires en erlenmeyer**

Pour les expériences préliminaires effectuées en erlenmeyer de 500 ml (Bellco®), un volume de 100 mL de boues stériles est utilisé. Le contrôle et les chocs de pH sont effectués à l'aide d'un papier pH Hydrion Brillant 3,5-9 (Micro Essential Laboratory). Le pH est mesuré chaque 6 heures et modifié avec une solution acide ( $H_2SO_4$  2N) ou basique (NaOH 2N) selon les expériences. Les fermentations sont effectuées dans un incubateur Environ-Shaker (Lab-Line) à température (30°C) et agitation (200 rpm) contrôlées. Les échantillonnages varient selon les expériences. Pour chaque échantillonnage en erlenmeyer, 0,5 ml de l'échantillon dans 4,5 ml de NaCl 0,85% est utilisé pour débiter la série de dilution servant au dénombrement des cellules et des spores viables. Le premier tube de la série de dilution contient 1 gramme de billes de verre stériles (5 mm de diamètre) pour séparer les cellules et les spores des particules en suspension des boues. Une partie de l'échantillon (4 - 6 ml) est conservée à -20°C dans une bouteille en plastique Nalgène stérile de 8 ml contenant 1 g. de billes de verre (5 mm de diamètre) pour les tests de toxicité ou la reprise des dénombrements cellulaires.

### **2.3.2 Expériences en bioréacteur (15 L)**

Les expériences sont effectuées dans des bioréacteurs en acier inoxydable de 15 L (Biogénie®) à température, pH, aération et agitation contrôlés à l'aide du logiciel FIX Version 5.5 sur un ordinateur NEC Pentium 100 Mhz. Le contrôle de la température se fait avec une boucle de recirculation de l'eau chauffée par un élément. Un système d'agitation à vitesse variable avec un

tachymètre permet le contrôle de l'agitation. L'aération est contrôlée par un débitmètre massique (Durkert). Le contrôle du pH s'effectue automatiquement ou manuellement avec des solutions acide ( $H_2SO_4$  2N) ou basique (NaOH 2N) par des pompes Easy-Load<sup>®</sup> Model 7518-60 (Masterflex<sup>®</sup>). Le contrôle de la mousse s'effectue manuellement avec un brise-mousse mécanique ou automatiquement avec une solution de polyéthylène glycol 10% par une pompe Easy-Load<sup>®</sup> Model 7518-60 (Masterflex<sup>®</sup>). Les données de pH et d'oxygène dissous sont recueillies à toutes les 6 secondes par des analyseurs numériques Rosemount Analytical Model 1054A (Rosemount<sup>®</sup> Analytical Inc.). Les données du pourcentage de  $CO_2$  dans les gaz de sortie sont recueillies à toutes les 15 minutes par des analyseurs numériques Rosemount Analytical Model 1870 (Rosemount<sup>®</sup> Analytical Inc.). Le programme informatique FIX Version 5.5 permet d'enregistrer automatiquement les données de pH, de température, des pourcentages de  $CO_2$  et de mousse, de l'agitation et de l'oxygène dissous.

Le volume de boues utilisé pour chaque expérience est de 10 L et 20 ml de polyéthylène glycol sont ajoutés pour empêcher la formation de mousse durant la stérilisation des boues. Avant le début de la fermentation, les boues sont stérilisées dans le bioréacteur à 121°C pendant 20 minutes. La stérilisation se fait avec la vapeur fournie par une chaudière à vapeur 48KW (Caloritech Inc.). L'inoculation se fait aseptiquement par l'une des extrémités du bioréacteur. Les fermentations durent 48 heures et se font à une température de 30°C, un pH de 7 et une agitation de 300 rpm. Dépendant des expériences, ces trois paramètres ne sont pas toujours constants. Les débits d'air varient entre 5-20 LPM (litres par minute) pour avoir continuellement plus de 20% d'oxygène dissous dans le milieu. De plus, durant la phase exponentielle de croissance, l'agitation peut varier entre 300 et 500 rpm pour conserver plus de 20% d'oxygène dissous dans le milieu. L'échantillonnage se fait à toutes les 3 heures durant les 24 premières heures et à toutes les 12 heures pour les 24 dernières heures. Le nombre d'échantillonnages peut varier selon les expériences. Les échantillons (20-30 ml) sont recueillis aseptiquement dans un tube de verre stérile avec 1 gramme de billes de verre (6 mm de diamètre) pour le dénombrement de cellules et de spores viables. Une partie de l'échantillon (4-6 ml) est conservée à -20°C dans une bouteille en plastique Nalgène stérile de 8 ml contenant 1 g. de billes de verre (5 mm de diamètre) pour les tests de toxicité ou la reprise des dénombrements cellulaires.

### 2.3.3 Précisions sur les variations brusques des paramètres abiotiques

Les chocs thermiques et les variations brusques de pH sont effectués à la fin de la phase exponentielle de croissance au début de la sporulation ou durant la phase stationnaire où le processus de la sporulation est en cours. Les variations brusques de pH sont effectuées avec une solution acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N alors que les chocs thermiques sont effectués en transférant les cultures dans un autre incubateur à température désirée. Lorsque Btk croît dans les boues d'épuration municipales contenant environ 25 g/l de MES et si la préculture a été réalisée dans le même milieu, la phase exponentielle de croissance commence rapidement dans l'heure suivant l'inoculation et se termine après 12-16 h (résultats non publiés). Les spores apparaissent généralement après 12 h de fermentation dans les boues et leur nombre augmente jusqu'à la fin de l'expérience (48 heures). Les résultats inclus dans ce document permettront de confirmer ou d'infirmer ces observations. Selon les expériences, les variations brusques des paramètres sont effectuées après 15 ou 24 heures de fermentation. Certaines modifications sont temporaires (1 h ou 3 h) et d'autres sont maintenues jusqu'à la fin de l'expérience.

## 2.4 Dénombrement des cellules et des spores viables

La numération des cellules et de spores viables est réalisée avec la technique de comptage en plaque (plate count). Après agitation sur un agitateur Maxi Mix II, des dilutions successives (0,5:4,5) de l'échantillon sont effectuées jusqu'à 10<sup>-7</sup> (selon le temps de fermentation) dans une solution NaCl 0,85%. Pour les trois dernières dilutions, un volume de 0,1 ml est étalé en triplicata à l'aide d'un râteau de verre préalablement stérilisé à l'éthanol 70% sur un milieu tryptique soja (« tryptic soy broth ou TSB », Difco) solidifié avec de l'agar (« bacto-agar », Difco). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 16 heures dans une étuve Imperial II Incubator (Lab-Line). Pour le dénombrement des spores, trois dilutions sont mises dans un bain-marie Thermo-Lift (Buchler Instrument) à 65°C pendant 15 min. et 0,1 ml de ces dilutions est étalé en triplicata sur un milieu solide tryptique soja agar avec un râteau de verre préalablement stérilisé à l'éthanol 70%. Les Pétri sont incubés à 30°C pendant 16 heures dans une étuve Imperial II Incubator (Lab-Line). Le dénombrement des unités formatrices de colonies (UFC) est effectué sur les Pétri contenant 30-300 colonies (plus grandes que 1mm) et les comptes sont rapportés en cellules ou spores par ml. L'erreur de la méthode d'étalement a été évaluée à 8%.

Pour chacune des fermentations, le taux de croissance ( $\mu$ ) est calculé avec le temps de génération ( $t_g$ ) qui correspond au temps requis pour que le nombre de cellules ( $N_0$ ) augmente de deux fois ( $2N_0$ ). Le temps de génération ( $t_g$ ) est obtenu avec la pente ( $m$ ) de la phase exponentielle de croissance, préalablement dessinée à la main sur papier millimétrique. Voici la formule :

$$m = (\log N_{t_1} - \log N_{t_2}) / (t_2 - t_1) = \mu$$

$$\ln 2N_0 - \ln N_0 = \mu \times t_g$$

$$\mu = 0,693 / t_g$$

Pour l'ensemble des expériences préliminaires, le peu de points sur la courbe de croissance (cellules/ml en fonction du temps) rend impossible le calcul du taux de croissance. Le calcul du taux de croissance a seulement été réalisé pour les expériences en bioréacteur.

## 2.5 Expériences

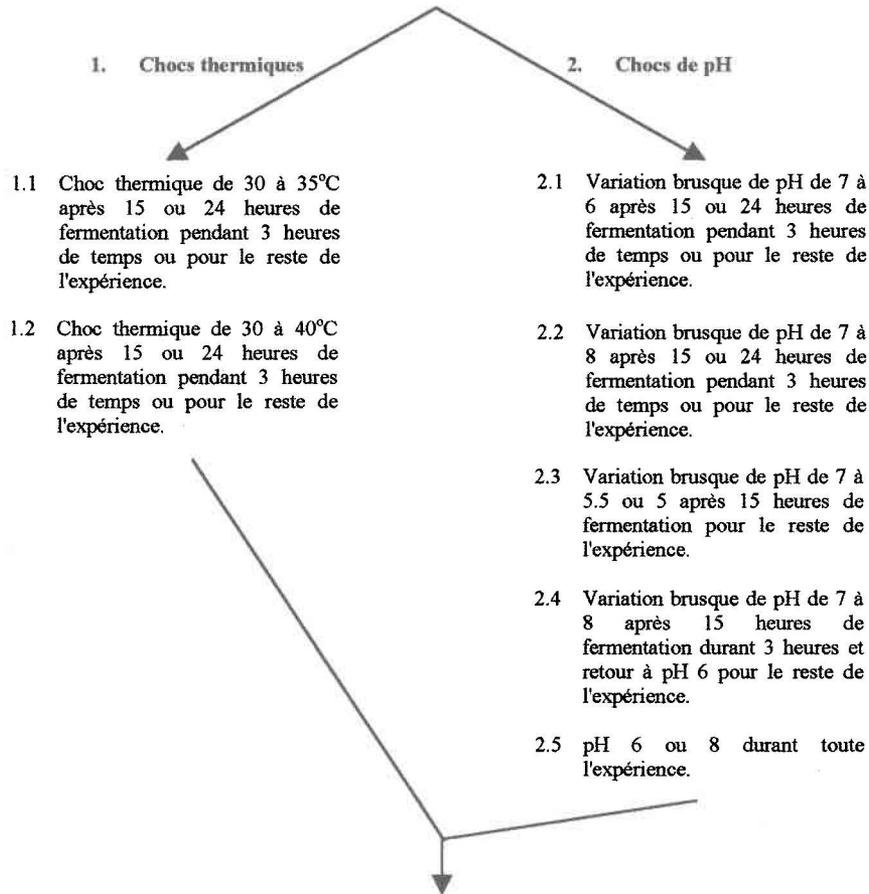
Les expériences débutent dans des fioles de 500 ml et les meilleures d'entre elles sont reproduites dans les bioréacteurs de 15 L. Une liste des expériences à réaliser dans le cadre de ce travail est présentée à la figure 5.

**A. Détermination des meilleures conditions en erlenmeyers de 500 ml, expériences préliminaires :**

Inoculum : préculture de Btk ou Bt-11 dans 100 ml de boues mixtes ou secondaires

Milieu de fermentation : 100 ml boues mixtes ou secondaires (MES ~ 25 g/l) avec 2% (v/v) d'inoculum

Paramètres contrôlés : température de 30°C, agitation de 200 rpm et pH 7



**B. Application des meilleures conditions déterminées en préliminaires, expériences en bioréacteur 15 L :**

Inocula : précultures de Btk ou Bt-11 dans 100 ml du milieu à fermenter

Milieu de fermentation : 10 L boues mixtes ou secondaires (MES ~ 25 g/l) avec 2% (v/v) d'inoculum

Paramètres contrôlés : température de 30°C, agitation de 300 rpm, pH 7 et débits d'air entre 5 et 12 LPM

**Figure 5 :** Schéma des expériences à réaliser pour atteindre les objectifs du projet.

## 2.6 Bioessais

Le potentiel entomotoxique s'effectue par des bioessais sur des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE, *Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera : Tortricidae). Un test de toxicité se déroule en trois phases. La première consiste à réveiller les larves en humidifiant un tissu contenant 1000 œufs de *C. fumiferana* avec une solution javalisée (2,5% v/v). Le tissu est aussitôt épongé et mis dans un bol en verre avec des cubes gélifiés de régime alimentaire stérile sous une lampe 60W à la température de la pièce. Toutes les larves surgissent après 24 heures. Les tissus sont fournis par Natural Resources Canada (Sault-Ste-Marie). Le régime alimentaire pour l'élevage des larves est fourni par le laboratoire de microbiologie du Ministère des Ressources Naturelles (Québec) et ses constituants sont énumérés dans le tableau 24 de l'annexe 1. La deuxième phase consiste à transférer les larves à l'aide d'un fin pinceau dans des petits contenants de plastique (SOLO) dont le fond est recouvert de régime alimentaire stérile (25-30 larves par contenant). Chaque petit contenant en plastique contient 30 ml de régime alimentaire stérile et leur couvercle est préalablement troué. La croissance des larves se fait pendant six jours à la température de la pièce. La troisième phase consiste à préparer trois dilutions (10X, 100X, 1000X) des échantillons à analyser et du standard Foray (préparation commerciale de 12600 UI /  $\mu$ l) afin de mettre 0,75 ml de l'échantillon ou du standard dilués dans 30 ml de régime alimentaire stérile contenant 1,5% d'agar. Rapidement, 1 ml du mélange est déposé dans un tube à bioessai 15 x 45 mm Opticlear® (Kimble Glass Inc.) avec un bouchon troué et cette manipulation est répétée pour un total de 20 tubes par échantillon (ou standard) dilué. Les témoins sont constitués en deux groupes de 25 tubes à bioessai avec 1 ml de diète stérile contenant 1,5% d'agar. Si la mortalité des larves dans les tubes témoins excède 10%, l'expérience est reprise. Préalablement, les tubes à bioessais sont autoclavés à 121°C pendant 15 minutes et leurs bouchons sont stérilisés sous les rayons UV pendant 24 heures dans une hotte à flux laminaire Bio Klone 2 (Microzone Corporation). Dans chacun des tubes contenant 1ml du mélange, une larve est déposée avec un fin pinceau. Tous les tubes sont placés sous une lampe 60W à la température de la pièce. Le dénombrement des larves mortes s'effectue à tous les jours pendant 7 jours. La mortalité et la toxicité sont rapportées en pourcentage et en UI /  $\mu$ l respectivement. La formule utilisée pour le calcul est la suivante :

$$\left( \frac{\% \text{mortalité échantillon } 10^{-1} + \% \text{mortalité échantillon } 10^{-2} + \% \text{mortalité échantillon } 10^{-3}}{\% \text{mortalité standard } 10^{-1} + \% \text{mortalité standard } 10^{-2} + \% \text{mortalité standard } 10^{-3}} \right) \times 12600 \text{ UI} / \mu\text{l} = \text{Entomotoxicité en UI} / \mu\text{l}$$

## **3 RÉSULTATS**

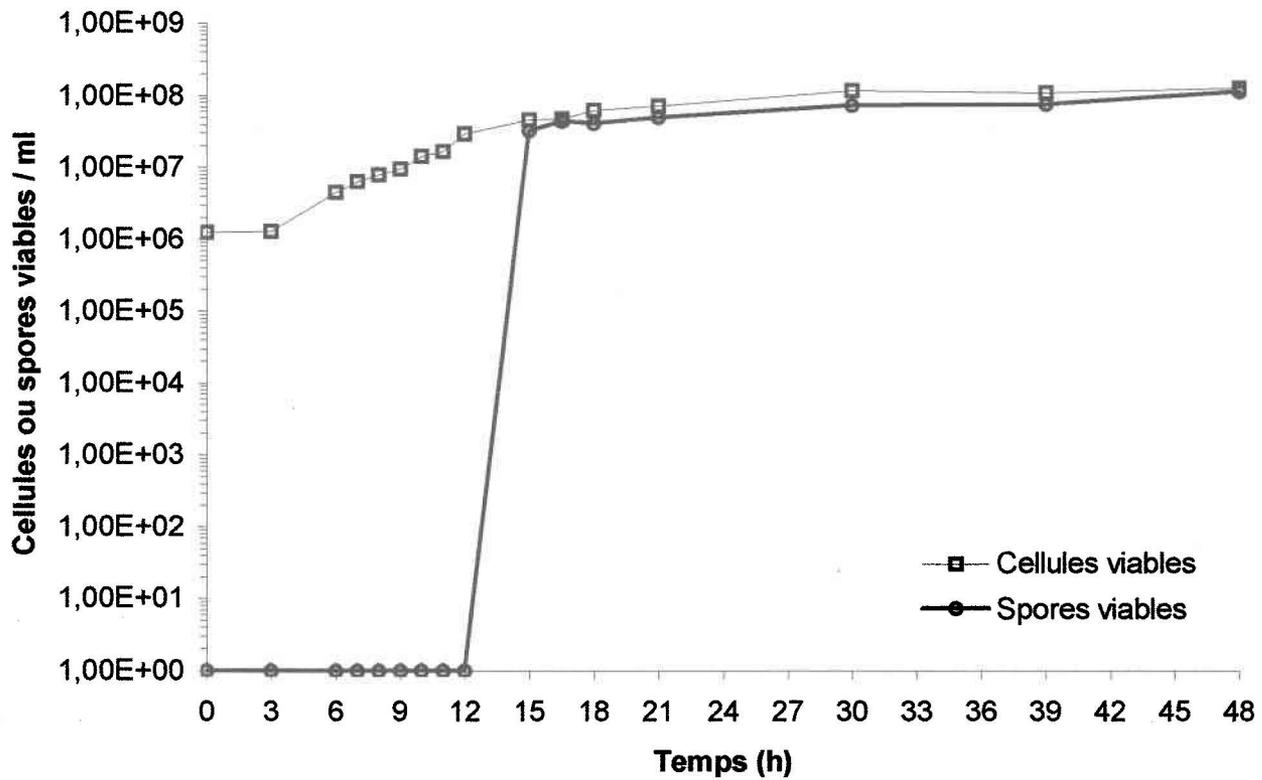
### **3.1 Fermentation des boues d'épuration par Btk**

Deux expériences ont été réalisées selon les meilleures conditions de fermentation déterminées dans la littérature (Bernhard et Urz, 1993) et par les chercheurs du Groupe de recherche en Assainissement de l'INRS-eau (résultats non publiés). Il est possible de distinguer les phases de croissance lors de la fermentation des boues mixtes par Btk (figure 6). Trois heures sont nécessaires à la bactérie pour s'adapter et sa phase exponentielle de croissance dure entre 9-12 h pour se terminer après 12-15 h de fermentation. Dans la fermentation de boues secondaires, la bactérie s'adapte rapidement et commence sa phase exponentielle de croissance dans la première heure (figure 7). Une étape de croissance lente après 9 h de fermentation suggère une seconde phase de croissance. La phase exponentielle de croissance se termine après 15-18 h de fermentation pour faire place à la phase stationnaire. Le taux de croissance de Btk est légèrement plus élevé (0,30/h) dans les boues secondaires que dans les boues mixtes (0,27/h).

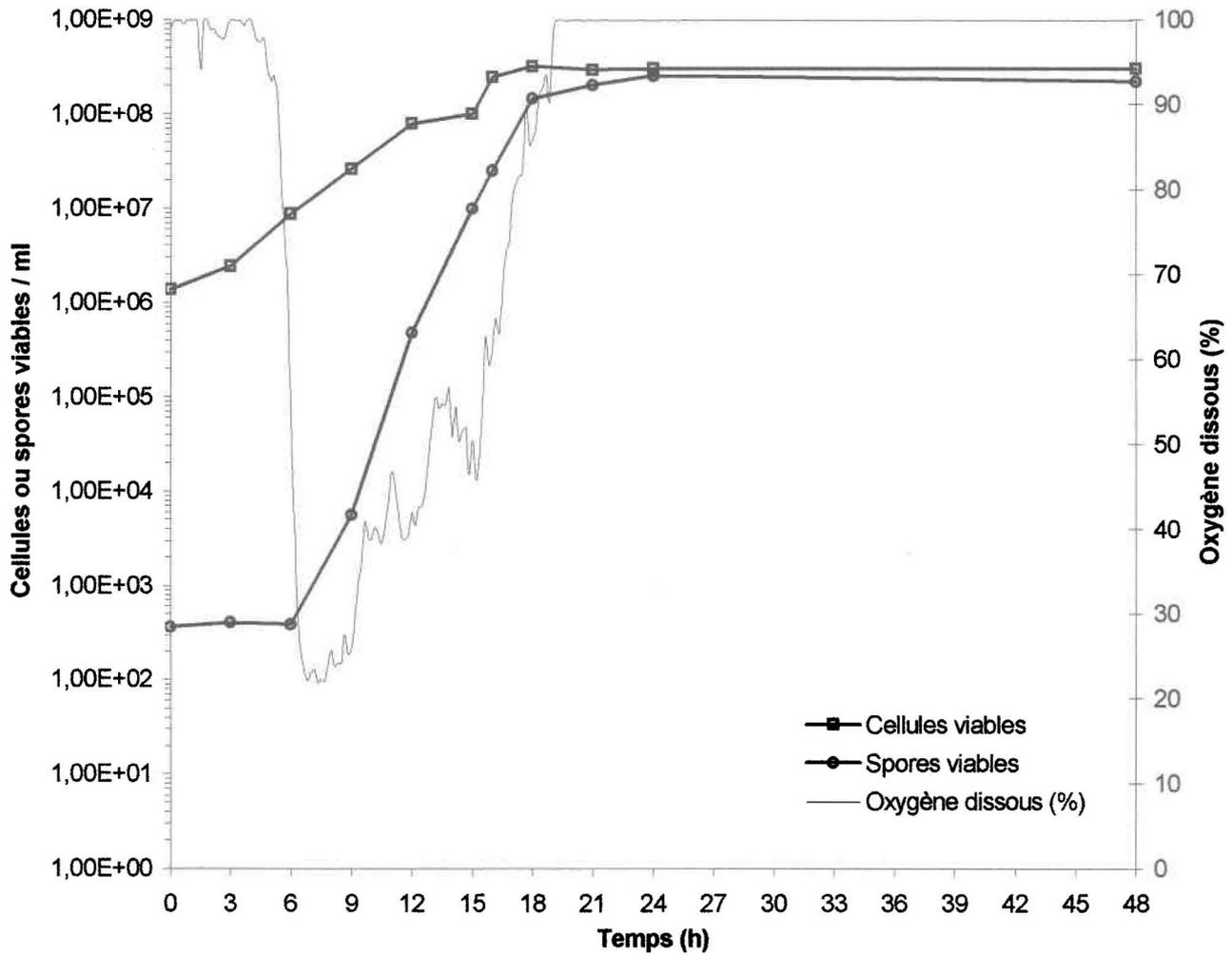
La concentration en cellules et spores viables est plus élevée dans les boues secondaires, mais la toxicité est plus faible par rapport à ce qui est obtenu dans les boues mixtes (tableau 4). En comparaison avec le milieu commercial le plus populaire (Foray™), le nombre de cellules et de spores viables ainsi que l'entomotoxicité sont plus faibles (tableau 4). Plusieurs expériences ont donc été effectuées pour vérifier si des chocs thermiques et de pH peuvent favoriser la sporulation et la production d'endotoxines.

**Tableau 4:** Concentration en cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de la fermentation de boues mixtes (CUQ 07-05-99) ou secondaires (CUQ 23-07-99) par Btk en bioréacteur (15L). Résultats après 48 heures en comparaison avec la préparation commerciale Foray™.

Milieu	Cellules ( $\times 10^7$ ) / ml		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité UI $\times 10^3$ / $\mu$ l
	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	
Boues mixtes	12,9	1,0	11,4	0,9	88,4	7,1	10,7
Boues secondaires	30,0	2,4	22,0	1,8	73,3	5,9	10,3
Foray™ (soya)	$\geq 100$	x	$\geq 100$	x	90,0	x	12,6



**Figure 6:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, pH 7, 300 rpm, 5-15 litres d'air par min. et  $\geq 20\%$  d'oxygène dissous dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues mixtes (CUQ 07-05-99). Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,39/h.



**Figure 7:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk et suivi de l'oxygène dissous lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, pH 7, 300 rpm, 5-15 litres d'air par min. dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,43/h.

### 3.2 Chocs de pH, expériences préliminaires en erlenmeyers

Plusieurs séries d'expériences ont été effectuées pour vérifier les effets de changements brusques de pH sur la croissance cellulaire, la sporulation et l'entomotoxicité. Les premières séries d'expériences sont effectuées dans les boues mixtes et les suivantes sont réalisées dans les boues secondaires. Toutes les expériences préliminaires sont réalisées en erlenmeyers. Chaque série d'expériences a son contrôle respectif. Au total, six séries d'expériences préliminaires ont été réalisées. Cette section présente les résultats selon le type de boues utilisées comme substrat et la bactérie qui les fermentent.

Avant d'entamer les prochaines sections, il est préférable de se familiariser avec le façon dont les chocs de pH (ou de température) sont exprimés dans les tableaux 5-22. Voici quelques exemples :

Ex. 1 : « **pH 7->6 (15 h)** »

Cela signifie un changement de pH 7 à 6 après 15 heures de fermentation et qui reste à cette valeur jusqu'à la fin de la fermentation. Ce type de choc est dit « acide ».

Ex. 2 : « **pH 7->6->7 (15-18 h)** »

Un choc de pH 7 à 6 est donné après 15 h et le pH est remis à 7 après 18 h jusqu'à la fin de la fermentation. Ce type de choc est dit « acide ».

Ex. 3 : « **pH 7->8->7 (15-18 h)** »

Un choc de pH 7 à 8 est donné après 15 h et le pH est remis à 7 après 18 h pour rester constant jusqu'à la fin de la fermentation. Ce type de choc est dit « basique ».

Ex. 4 : « **pH 7->8->6 (15-18-24 h)** »

Un choc de pH 7 à 8 est donné après 15 h et le pH est modifié à 6 après 18 h. Le pH revient à 7 après 24 h pour rester à cette valeur jusqu'à la fin de la fermentation. Ce type de choc est dit « basique-acide ».

Ex. 5 : « **pH 7->8->6 (24-27-48 h)** »

Un choc de pH 7 à 8 est donné après 24 h et le pH est modifié à 6 après 27 h pour conserver cette valeur jusqu'à la fin de la fermentation. Ce type de choc est dit « basique-acide ».

### 3.2.1 Btk dans les boues mixtes

Trois séries d'expériences ont été réalisées avec Btk dans des boues mixtes. Le tableau 5 indique les concentrations de cellules et de spores viables ainsi que l'entomotoxicité obtenues après 48 h de fermentation. Le tableau 6 présente les valeurs de la concentration en spores et du taux de sporulation afin de vérifier si Btk réagit au choc.

**Tableau 5:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Btk (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats des séries d'expériences no.1, 2 et 3 après 48 heures de fermentation.

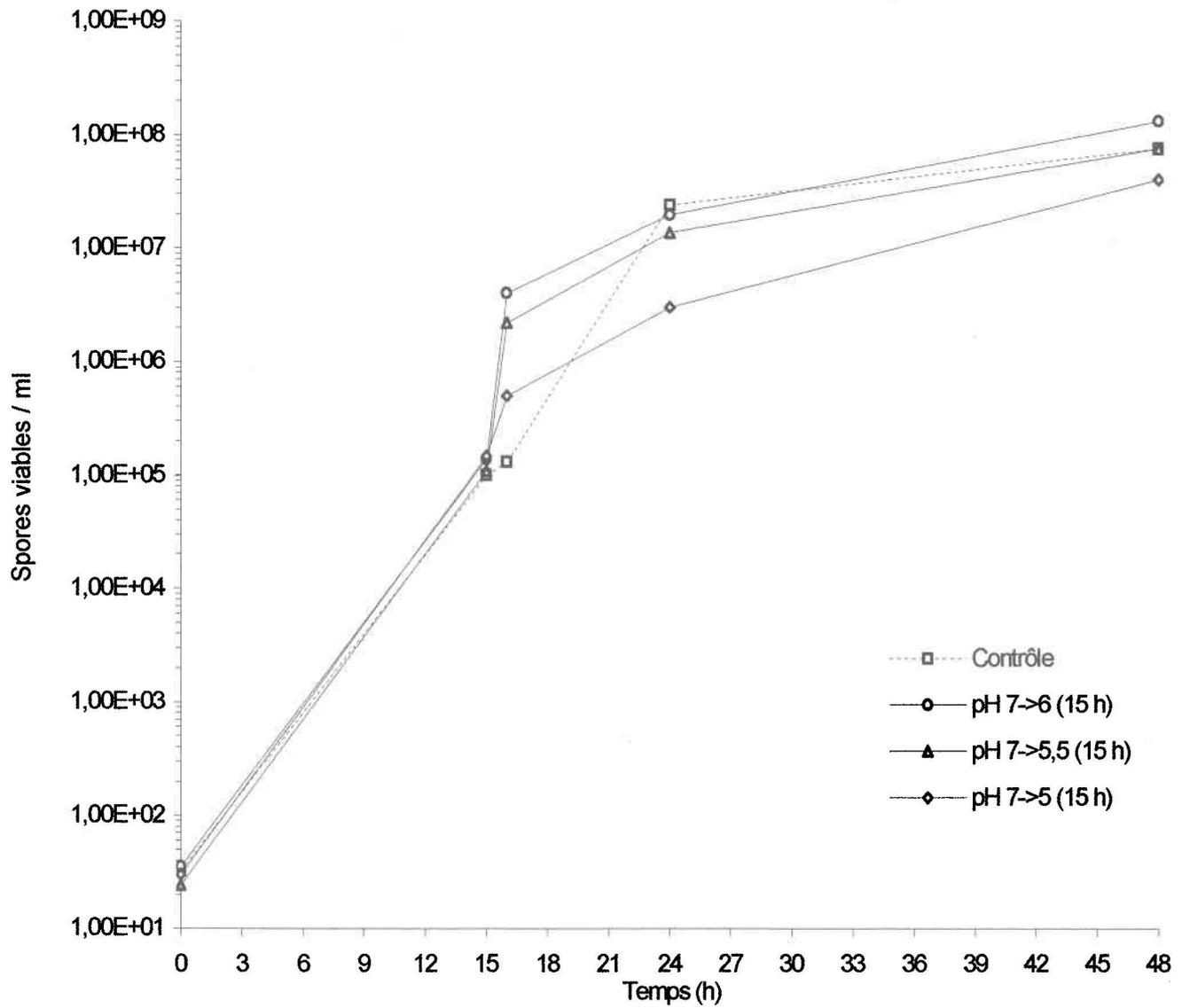
Série	Expériences	Cellules ( $\times 10^7$ ) /ml		Spores ( $\times 10^7$ ) /ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%) <sup>*1</sup>
no.1	Contrôle, pH 7	10,5	0,8	7,5	0,6	71,4	5,7	10,9	x
	pH 7->6 (15 h)	14,5	1,2	13,0	1,0	89,7	7,2	10,0	-8,0
	pH 7->5.5 (15 h)	11,5	0,9	7,5	0,6	65,2	5,2	10,8	-2,0
	pH 7->5 (15 h)	6,0	0,5	4,0	0,3	66,7	5,3	2,5	-77,0
no. 2	Contrôle, pH 7	6,9	0,6	6,0	0,5	87,0	7,0	8,5	x
	pH 7->6->7 (15-18 h)	6,1	0,5	6,0	0,4	98,4	0,1	10,3	17,5
	pH 7->6 (24 h)	7,2	0,6	5,5	0,5	76,4	6,1	12,1	29,8
	pH 6 constant	0,03	0,0024	0,01	0,001	33,3	2,7	7,4	-12,9
no. 3	Contrôle, pH 7	11	0,9	7,8	0,8	70,9	5,6	8,4	x
	pH 7->6 (15 h)	12	1,0	10	0,6	83,3	6,7	10,9	22,9
	pH 7->8->6 (15-18-24 h)	11,1	0,9	9,0	0,7	81,1	6,5	12,3	31,7
	pH 7->8->7 (15-18 h)	6,9	0,6	4,7	0,4	68,0	5,4	9,7	13,4

\*1 Différence par rapport à leur contrôle respectif.

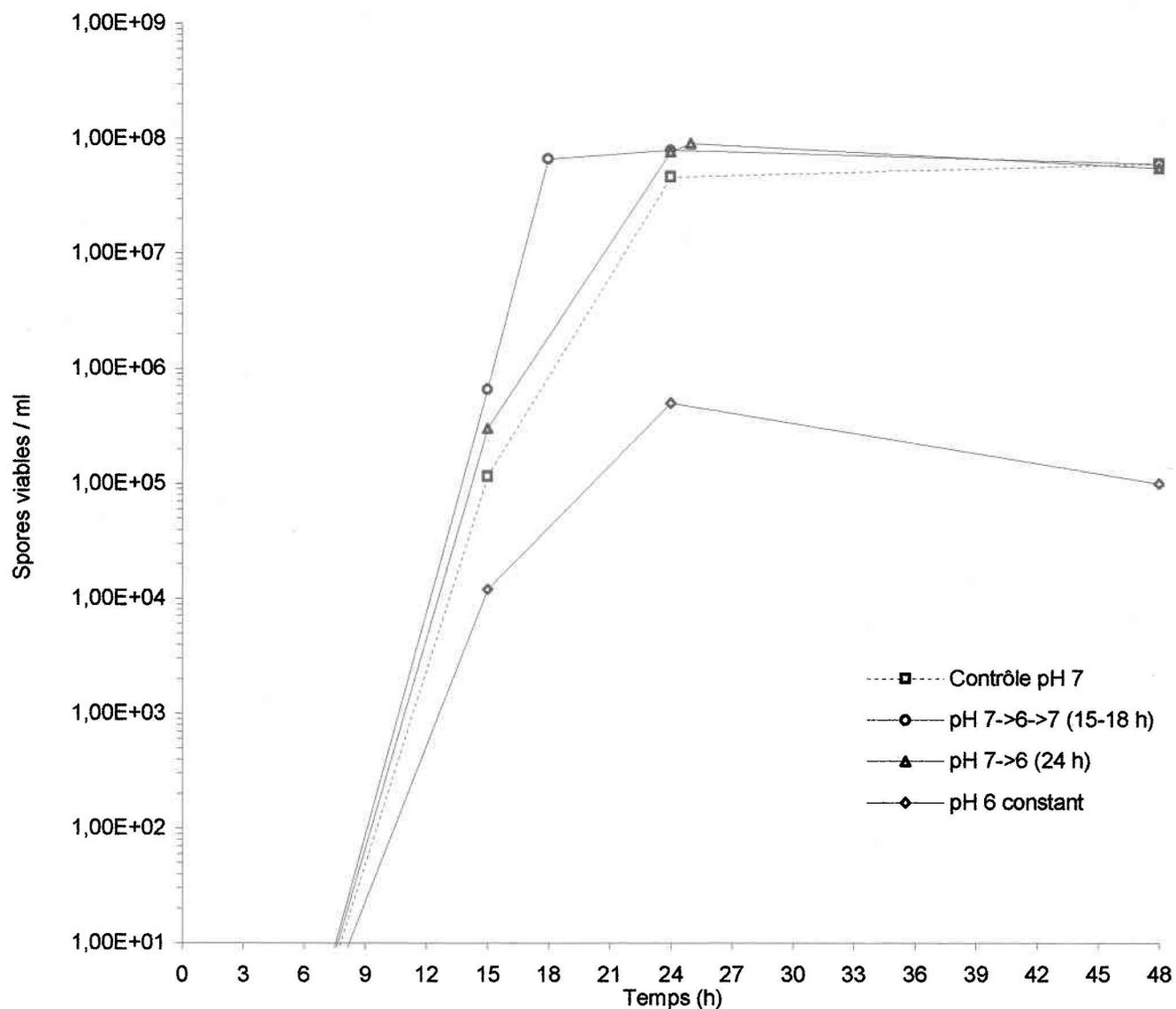
**Tableau 6:** Dénombrement des spores et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Btk (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats des séries d'expériences no.1, 2 et 3.

Série	Choc pH	T (h)	Avant choc				Après choc*					
			Spores x10 <sup>7</sup> / ml		Sporulation (%)		Spores x10 <sup>7</sup> / ml		Sporulation (%)			
			moy.	σ	moy.	σ	T (h)	moy.	σ	moy.	σ	
no.1	Contrôle, pH 7	15	0,01	0	0,5	0	16	0,013	0	0,6	0,1	
	pH 7->6 (15 h)	15	0,0138	0	0,6	0,1	16	0,4	0,03	18,6	1,5	
	pH 7->5,5 (15 h)	15	0,0108	0	0,6	0,1	16	0,22	0,02	11,6	0,9	
	pH 7->5 (15 h)	15	0,0146	0	0,9	0,1	16	0,05	0	2,4	0,2	
no.2	Contrôle, pH 7	15	0,0115	0	0,1	0	16	x	x	x	x	
		18					18	x	x	x	x	
			24	4,6	0,4	53,5	4,3	25	x	x	x	x
	pH 7->6->7 (15-18 h)	15	0,066	0	0,8	0,1	16	x	x	x	x	
							18	6,6	0,5	71,4	5,7	
							24	7,9	0,6	71,8	5,7	
	pH 7->6 (24 h)	24	7,65	0,6	79,7	6,4	25	9	0,7	91,8	7,3	
no.3	Contrôle, pH 7	15	0,1	0	1,4	0,1	16	x	x	x	x	
		18					18	5,2	0,4	54,2	4,3	
	pH 7->6 (15 h)	15	8,3	0,7	0,2	0	16	x	x	x	x	
							18	8,15	0,7	63,7	5,1	
	pH 7->8->6 (15-18-48 h)	15	1,5	0,1	0,2	0	16	x	x	x	x	
							18	4,2	0,3	45,7	3,7	
	pH 7->8->7 (15-18 h)	15	1,2	0,1	0,2	0	16	x	x	x	x	
							18	3,3	0,3	42,4	3,4	

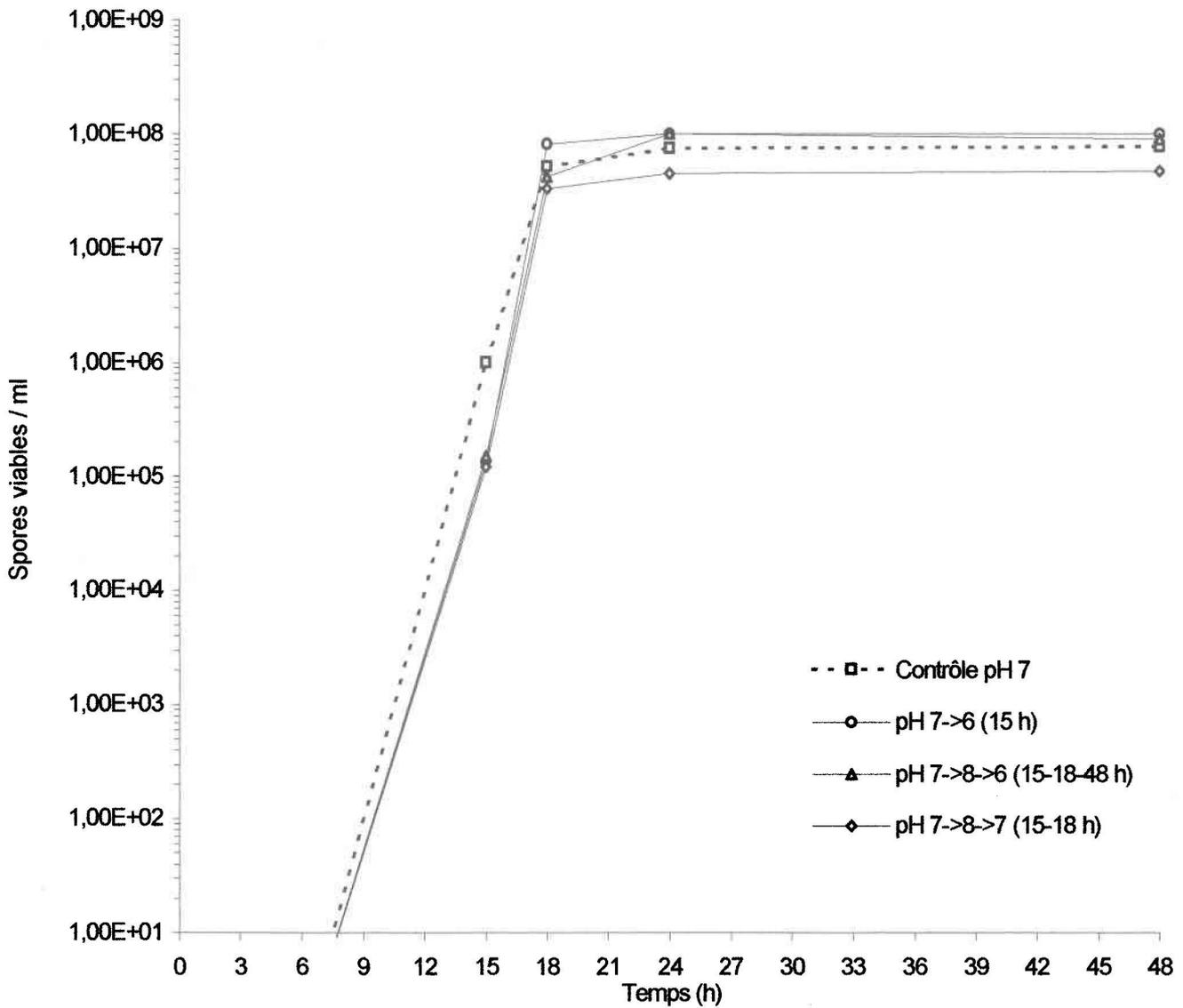
\* x = résultats non disponibles. Pour la 2<sup>ème</sup> série d'expériences, les comparaisons sont effectuées avec T=24 du contrôle alors que pour la 3<sup>ème</sup> série d'expériences, c'est le T=18 du contrôle qui est utilisé pour la comparaison.



**Figure 8:** Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.1) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).



**Figure 9:** Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.2) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).



**Figure 10:** Dénombrement des spores viables de Btk suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.3) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).

Selon la figure 8 et le tableau 6, Btk réagit aux divers chocs de pH dans la 1<sup>ère</sup> série d'expériences. Une heure après un choc de pH de 7 à 6 (T=16), Btk réagit fortement par un accroissement du nombre de spores ( $4 \times 10^6$  spores/ml) pour atteindre un taux de sporulation de 18,6% par rapport à 0,6% et  $1,3 \times 10^5$  spores/ml au même temps avec le contrôle. De plus, lorsque qu'un choc de pH de 7 à 6 (T=16) est appliqué, le taux de sporulation après 48 h de fermentation (89,4%) est supérieur à celui du contrôle (71,4%). Un choc de pH de 7 à 5,5 entraîne aussi une augmentation de spores une heure suivant le choc avec un taux de sporulation passant de 0,6% à 11,6%, une augmentation de 10% par rapport au témoin (tableau 6). Cependant, à la fin de l'expérience, un choc de pH de 7 à 5,5 n'augmente pas le nombre de spores et le taux de sporulation alors qu'un choc de pH 7 à 5 diminue considérablement le nombre de cellules et de spores ainsi que l'entomotoxicité (tableau 5). Le choc de pH 7 à 6 est alors pris en considération pour les prochaines expériences.

Selon la figure 9, Btk réagit à un choc de pH acide réalisé après 15 h de fermentation, phénomène déjà observé dans la 1<sup>ère</sup> série d'expériences. Toutefois dans le tableau 5, un choc temporaire de trois heures (pH 7->6->7) n'influence pas le nombre de spores produites après 48 heures de fermentation en comparaison avec le contrôle. Lorsqu'un choc de pH 7->6 est effectué après 24 h de fermentation, le taux de sporulation et l'entomotoxicité sont plus élevés à la fin de la fermentation (T=48). Selon le tableau 5 et la figure 9, une fermentation réalisée à pH 6 est défavorable à la croissance cellulaire, à la production de spores et à l'entomotoxicité.

Des chocs de pH basiques ont aussi été appliqués (figure 10). Un choc de pH basique d'une durée de trois heures (pH 7->8->7), appliqué après 15 h de fermentation, ne favorise pas la sporulation et l'entomotoxicité. Toutefois, si le pH descend à 6 après trois heures de fermentation lorsque ce dernier est basique (pH 7->8->6), une forte entomotoxicité est obtenue à la fin d'une fermentation de 48 h. Comme dans la série d'expériences no.1 (figure 8), un choc de pH 7 à 6 après 15 h de fermentation a été appliqué dans la série d'expériences no.3 (figure 10). Btk a encore réagit à ce type de choc avec  $8,15 \times 10^7$  spores/ml produites et 63,7% de sporulation après 18 h de fermentation en comparaison avec  $5,2 \times 10^7$  spores/ml et 54,2% pour le contrôle. En somme, un choc de pH acide appliqué après 15 ou 24 h de fermentation lors d'une fermentation de boues mixtes débutant à pH 7 augmente le nombre de spores produites ou l'entomotoxicité des

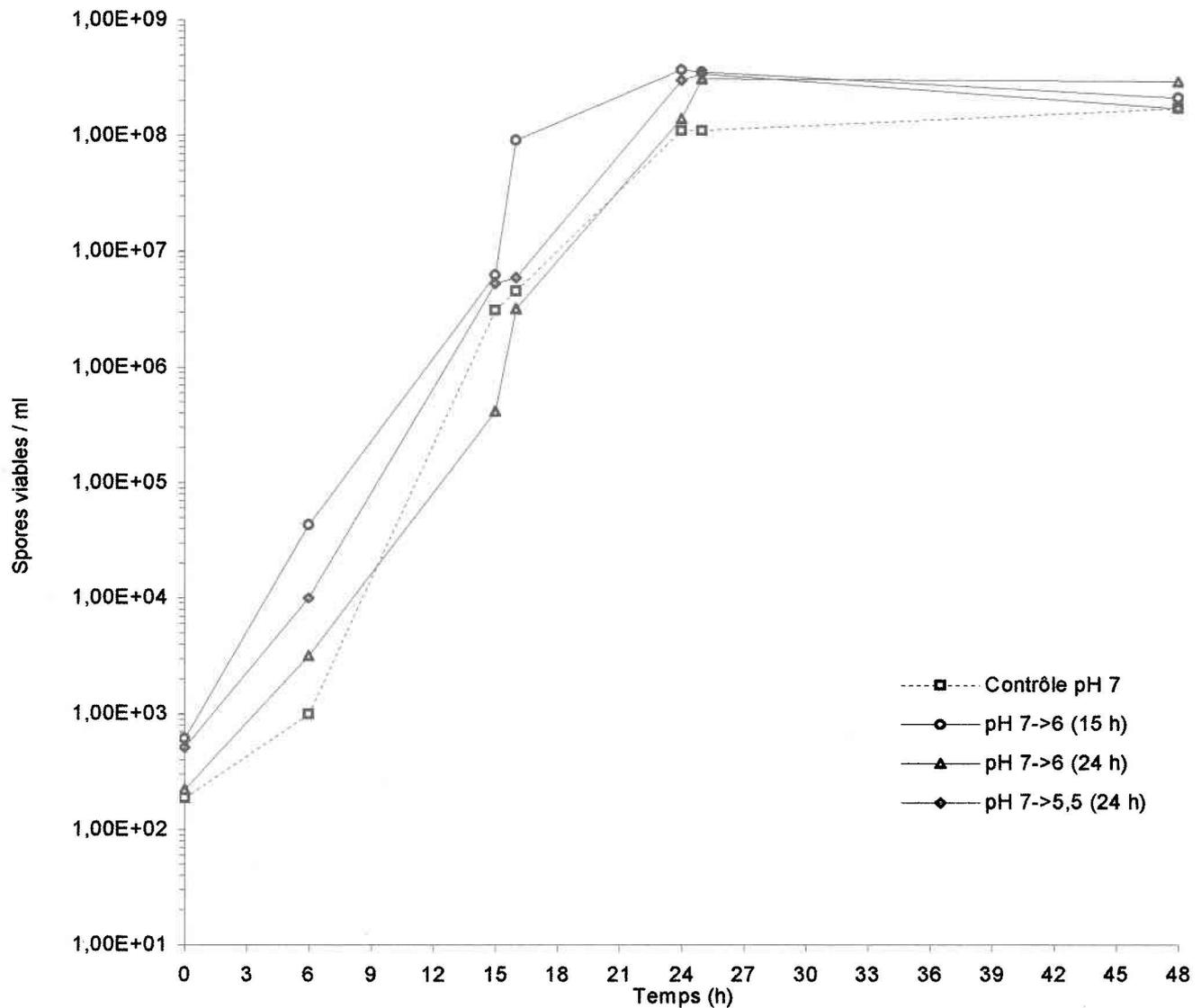
suspensions de Btk. De plus, un choc de pH basique avant un choc acide (pH 7->8->6) favorise grandement l'entomotoxicité après une fermentation de 48 heures dans les boues mixtes.

### 3.2.2 Bt-11 dans les boues mixtes

Plusieurs des expériences précédentes ont été reprises avec la nouvelle souche bactérienne Bt-11. Une forte biomasse de cellules et de spores est obtenue avec Bt-11 lors de la fermentation de boues mixtes en comparaison avec Btk. Des chocs de pH 7 à 6 après 15 ou 24 h de fermentation augmentent le nombre de spores produites, le taux de sporulation et l'entomotoxicité de la suspension (tableau 7). Lorsqu'un choc de pH 7 à 5,5 est effectué, les concentrations en cellules et en spores sont similaires en comparaison avec le témoin, mais l'entomotoxicité du produit augmente de 14%.

**Tableau 7:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Bt-11 (CUQ 07-05-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.4 après 48 heures.

Expériences	Cellules $\times 10^7$ / ml		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%)
Contrôle, pH 7	23,0	1,8	17,0	1,4	73,9	5,9	9,1	x
pH 7->6 (15 h)	25,0	2,0	21,0	1,7	84,0	6,7	11,5	27
pH 7->6 (24 h)	31,0	2,5	29,0	2,3	93,5	6,5	10,7	18
pH 7->5,5 (24 h)	21,0	1,7	17,0	1,4	81,0	6,5	10,4	14



**Figure 11:** Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.4) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues mixtes (CUQ 07-05-99).

La figure 11 et le tableau 8 montrent que la réaction de Bt-11 au choc de pH acide réalisé après 15 h de fermentation est significative une heure après le choc (T=16) avec 22,3% de sporulation et  $9,15 \times 10^7$  spores/ml produites en comparaison avec 6,3% et  $4,5 \times 10^6$  spores/ml pour le contrôle. Suite à l'application d'un choc acide après 24 heures de fermentation, le même phénomène s'observe une heure après le choc (T=25) : un taux de sporulation de 83,8% est alors obtenu en comparaison avec 45,8% pour le contrôle. Bt-11 ne réagit pas significativement à un choc de pH de 7 à 5,5 réalisé après 24 heures de fermentation : le nombre de spores est passé de  $3 \times 10^8$  spores/ml à  $3,4 \times 10^8$  spores/ml. Finalement, dans la figure 11, une diminution du nombre de spores de Bt-11 est constatée vers la fin des fermentations ayant subi un choc de nature acide.

**Tableau 8 :** Dénombrement des spores et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues mixtes par Bt-11 (CUQ 07-05-99, M.E.S.  $\approx 18$  g/L) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.4.

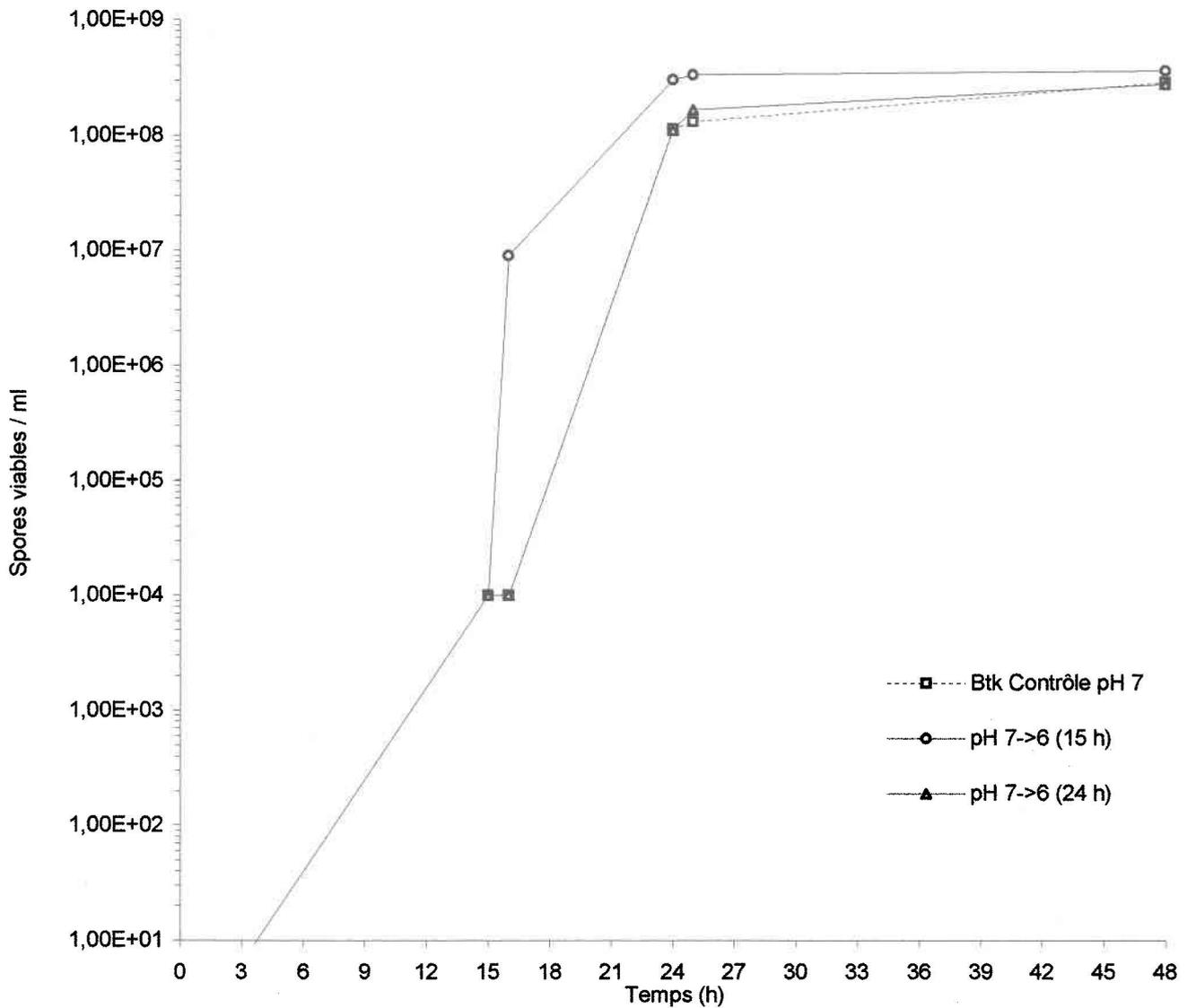
Choc pH	T (h)	<u>Avant choc</u>				<u>Après choc</u>				
		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	T (h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$
Contrôle, pH 7	15	0,31	0,02	5,0	0,4	16	0,45	0,04	6,3	0,5
	24	11	0,9	44,0	3,5	25	11	0,9	45,8	3,7
pH 7->6 (15 h)	15	0,625	0,05	2,3	0,2	16	9,15	0,7	22,3	1,8
pH 7->6 (24 h)	24	14	1,1	43,8	3,5	25	31	2,5	83,8	6,7
pH 7->5,5 (24 h)	24	30	2,4	66,7	5,3	25	34	2,7	75,6	6,0

### 3.2.3 Btk et Bt-11 dans les boues secondaires

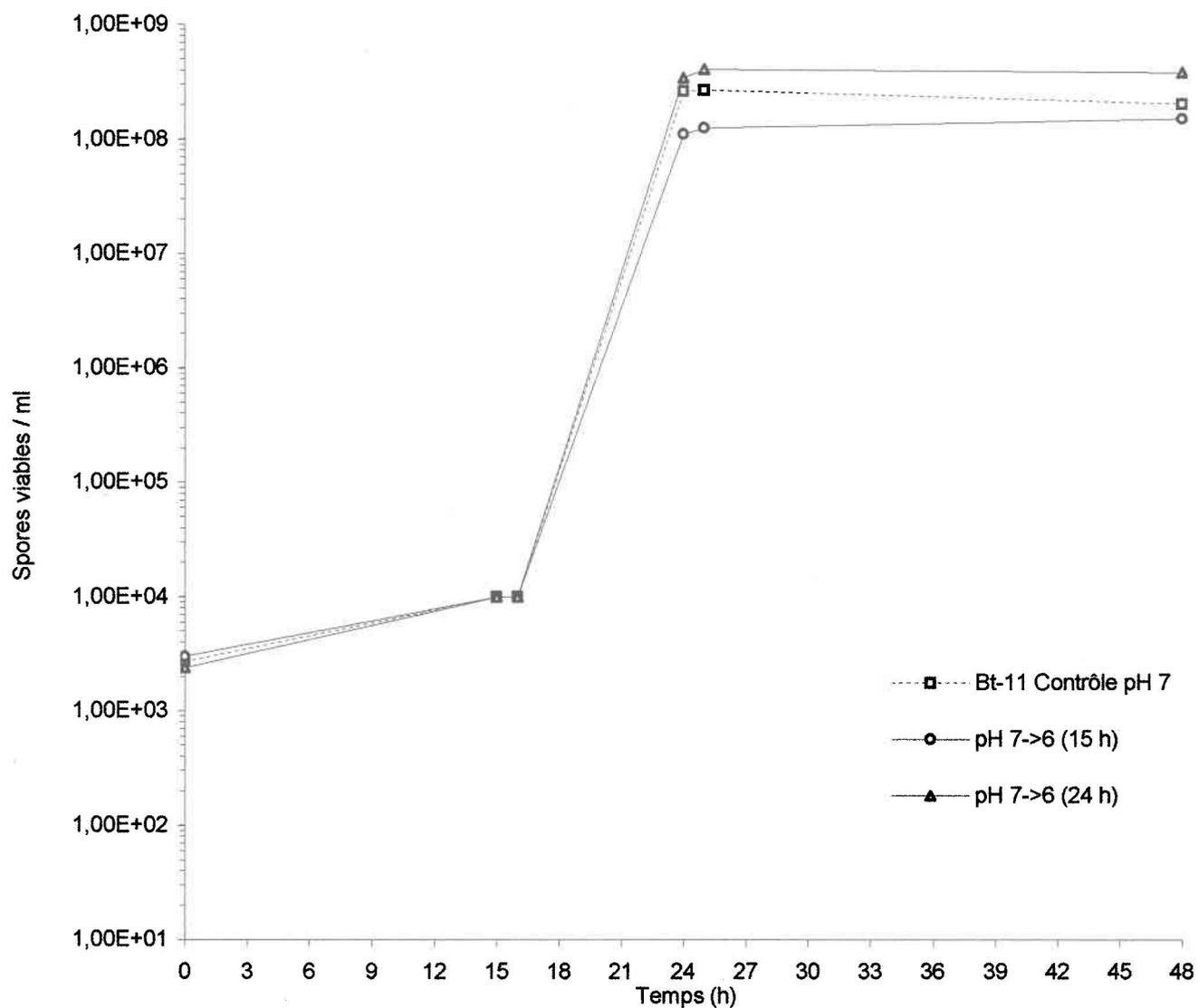
Deux séries d'expériences ont été effectuées dans les boues secondaires. De hautes concentrations de cellules et de spores ont été obtenues avec Btk et Bt-11 lors de la fermentation des boues secondaires (tableau 9). Ce sont les boues secondaires qui permettent d'obtenir les plus grandes concentrations de cellules et de spores de Bt. Une entomotoxicité élevée est obtenue lorsqu'un choc acide (pH 7->6) est appliqué après 15 h de fermentation des boues secondaires, observation déjà faite avec le même type de choc dans les boues mixtes. Les entomotoxicités obtenues dans les boues secondaires avec Bt-11 sont faibles par rapport à celles obtenues dans les boues mixtes (série d'expériences no.4). Les chocs de pH acides appliqués après 15 et 24 h semblent défavorables à la production de toxines chez Bt-11 : 25,8 % et 14 % de diminution sont observées dans les deux cas.

**Tableau 9:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues secondaires par Bt-11 (CUQ 25-06-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.5 et 6 après 48 heures.

Série	Expériences	Cellules $\times 10^7$ / ml		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%)
no.5	Btk, contrôle, pH 7	40,0	3,2	28,5	2,3	71,3	5,7	11,3	x
	pH 7->6 (15 h)	56,0	4,5	36,0	2,9	64,3	5,1	12,7	12,1
	pH 7->6 (24 h)	37,0	3,0	27,5	2,2	74,3	5,9	12,0	5,5
no.6	Bt-11, contrôle, pH 7	25,0	2,0	20,0	1,6	80,0	6,4	8,6	x
	pH 7->6 (15h)	20,0	1,6	15,0	1,2	75,0	6,0	6,4	-25,8
	pH 7->6 (24 h)	44,0	3,5	30,0	2,4	86,4	6,9	7,4	-14,0



**Figure 12:** Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.5) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 25-06-99).



**Figure 13:** Dénombrement des spores viables de Bt-11 suite à divers chocs de pH acide lors de plusieurs fermentations de 48 heures (série d'expériences no.6) à 30°C et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 25-06-99).

La figure 12 met en évidence la réaction de Btk au choc de pH acide appliqué après 15 h de fermentation. Selon le tableau 10, le nombre de spores de Btk a augmenté considérablement une heure suivant le choc (T=16) où la concentration de spores est passée de  $1 \times 10^4$  spores/ml à  $9 \times 10^6$  spores/ml (près de 1000 fois plus de spores) comparativement au contrôle où le nombre de spores est resté à  $1 \times 10^4$  spores/ml. Cela n'a pas été observé pour le choc de pH acide réalisé après 24 h de fermentation par Btk. Toutefois, le taux de sporulation de Btk est passé de 48,9% à 71,7% alors qu'il a très peu changé dans le contrôle, passant de 26,9% à 31%.

La série d'expériences no.6 illustrée dans la figure 13 montre que Bt-11 ne réagit pas aux chocs de pH appliqués après 15 ou 24 h de fermentation dans les boues secondaires : les résultats sont similaires au contrôle à l'exception de l'entomotoxicité qui diminue légèrement dans les deux cas (tableau 9).

**Tableau 10:** Dénombrements des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors de plusieurs fermentations de boues secondaires par Bt-11 (CUQ 25-06-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.5 et 6.

Série	Choc pH	T (h)	Avant choc				Après choc				
			Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		
			moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	T (h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$
no.5	Btk, contrôle, pH 7	15	< 0,1	0	0	0	16	0,6	0,1	0	0
		24	11,2	0,9	26,9	2,2	25	13,0	1,0	31,0	2,5
	pH 7->6 (15 h)	15	< 0,1	0	0	0	16	0,9	0,1	9,9	0,8
	pH 7->6 (24 h)	24	11,0	0,9	48,9	3,9	25	16,5	1,3	71,7	5,7
No.6	Bt-11, contrôle, pH 7	15	< 0,1	0	0	0	16	< 0,1	0	0	0
		24	26,0	2,1	46,0	3,7	25	26,6	2,1	48,4	3,9
	pH 7->6 (15 h)	15	< 0,1	0	0	0	16	< 0,1	0	0	0
	pH 7->6 (24 h)	24	34,0	2,7	64,2	5,1	25	40,5	3,2	73,6	5,9

### 3.3 Chocs thermiques, expériences préliminaires en erlenmeyers

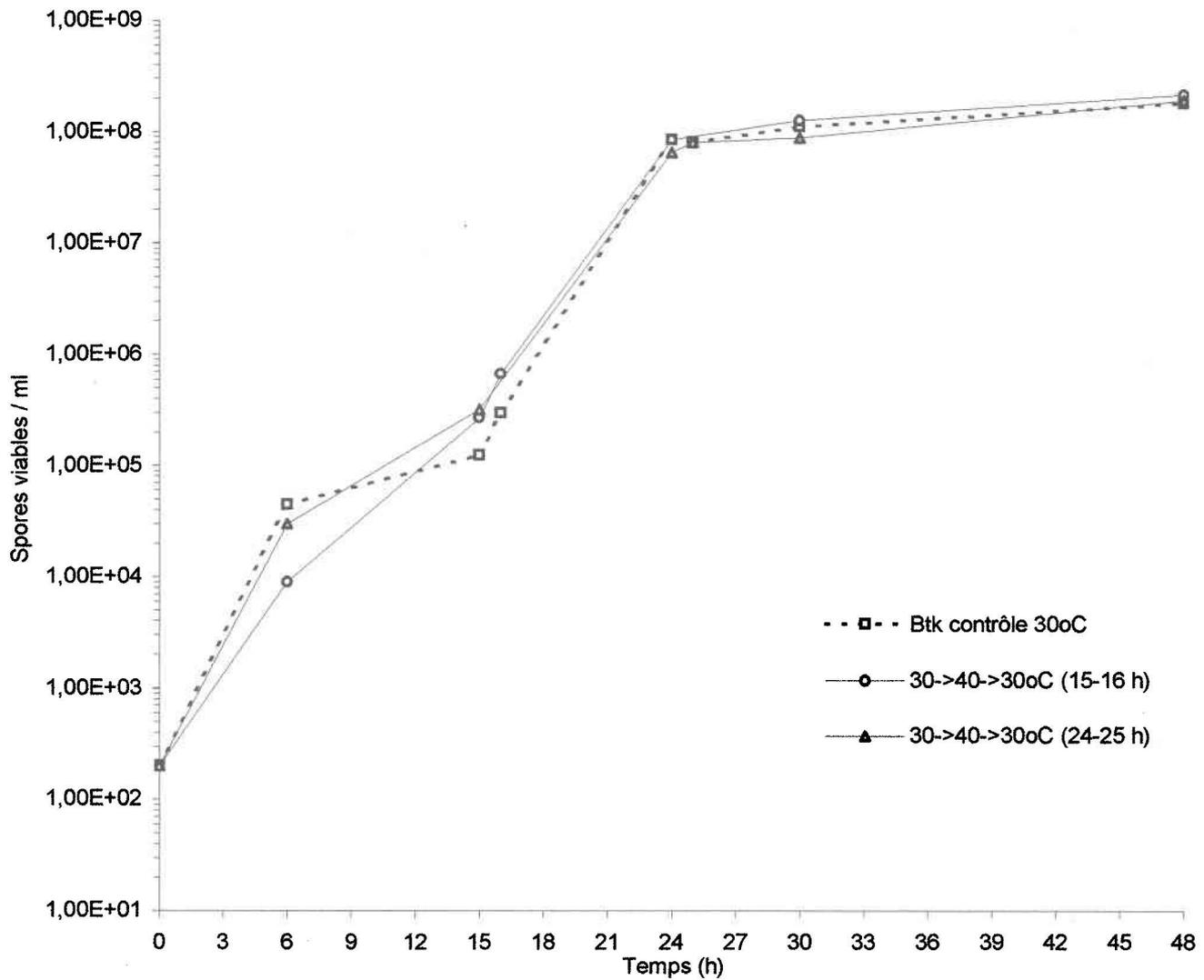
Le tableau 11 et la figure 14 montrent une série de fermentations effectuées en erlenmeyers pour étudier l'effet des chocs thermiques sur la sporulation. Les taux de sporulation et les entomotoxicités obtenus après 48 h de fermentation sont plus faibles lorsqu'un choc thermique a été appliqué durant la phase de sporulation. Toutefois, le nombre de cellules viables a augmenté dans les fermentations où un choc thermique a été effectué. Aucune différence significative dans le nombre de spores et le taux de sporulation n'est observée une heure après l'application de choc thermique (tableau 12).

**Tableau 11:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) à pH 7 en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.7 après 48 heures.

Chocs thermiques	Cellules ( $\times 10^7$ ) / ml		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%)
Btk, contrôle, 30°C	23,8	1,9	18,0	1,4	75,6	6,1	10,7	x
30->40->30°C (15-16 h)	49,0	3,9	21,3	1,7	43,5	3,5	9,3	-15,1
30->40->30°C (24-25 h)	33,5	2,7	19,1	1,5	57,0	4,6	9,6	-11,5

**Tableau 12:** Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en erlenmeyer. Résultats de la série d'expériences no.7.

Choc pH	T (h)	Avant choc				Après choc				
		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	
Btk, contrôle, 30°C	15	0,013	0	0,1	0	16	0,03	0	0,2	0
	24	8,5	0,7	27,0	2,2	25	8	1,0	27,1	2,2
30->40->30°C (15-16 h)	15	0,027	0	0,2	0	16	0,067	0	0,4	0
30->40->30°C (24-25 h)	24	6,5	0,5	43,3	3,5	25	8,1	0,7	48,3	3,9



**Figure 14:** Dénombrement des spores viables de Btk après l'application de chocs thermiques lors de fermentations de 48 h (série d'expériences no.7) à pH 7 et 200 rpm d'agitation en erlenmeyers contenant 100 ml de boues secondaires (CUQ 23-07-99).

### 3.4 Compte rendu des expériences préliminaires en erlenmeyers

En somme, Btk et Bt-11 réagissent favorablement à divers types de chocs de pH en autant qu'ils soient appliqués après 15 ou 24 h de fermentation et qu'ils ne descendent sous un pH 6. Un choc de pH acide ou basique entraîne une augmentation du nombre de spores, du taux de sporulation et de l'entomotoxicité. Le choc de pH peut être temporaire ou constant et la réaction de Btk se fait généralement dans l'heure suivant le début du choc. **Les plus fortes entomotoxicités et les meilleures sporulations sont obtenues avec Btk dans les boues secondaires.** Cependant, l'entomotoxicité est très faible lorsque Bt-11 fermente les boues secondaires avec ou sans choc de pH. Ces dernières considérations sont prises en compte pour les expériences en bioréacteur de 15 litres. Finalement, compte tenu de la baisse d'entomotoxicité et du faible taux de sporulation observés dans la série d'expériences no 7, aucune expérience de chocs thermiques n'est reproduite en bioréacteur.

### 3.5 Chocs de pH, expériences en bioréacteur (15 L)

Plusieurs expériences en bioréacteur ont été effectuées en tenant compte des meilleurs résultats obtenus dans les expériences préliminaires en erlenmeyers. Les résultats en bioréacteur sont présentés selon le nombre et le type de chocs appliqués durant les fermentations. Au total, sept expériences (A, B, C, D, E, F et G) ont été réalisées dans les boues secondaires. Pour ces sept expériences, les problèmes avec les sondes d'oxygène des bioréacteurs n'ont pas permis un suivi exact de l'oxygène dissous durant les fermentations.

#### 3.5.1 Contrôle

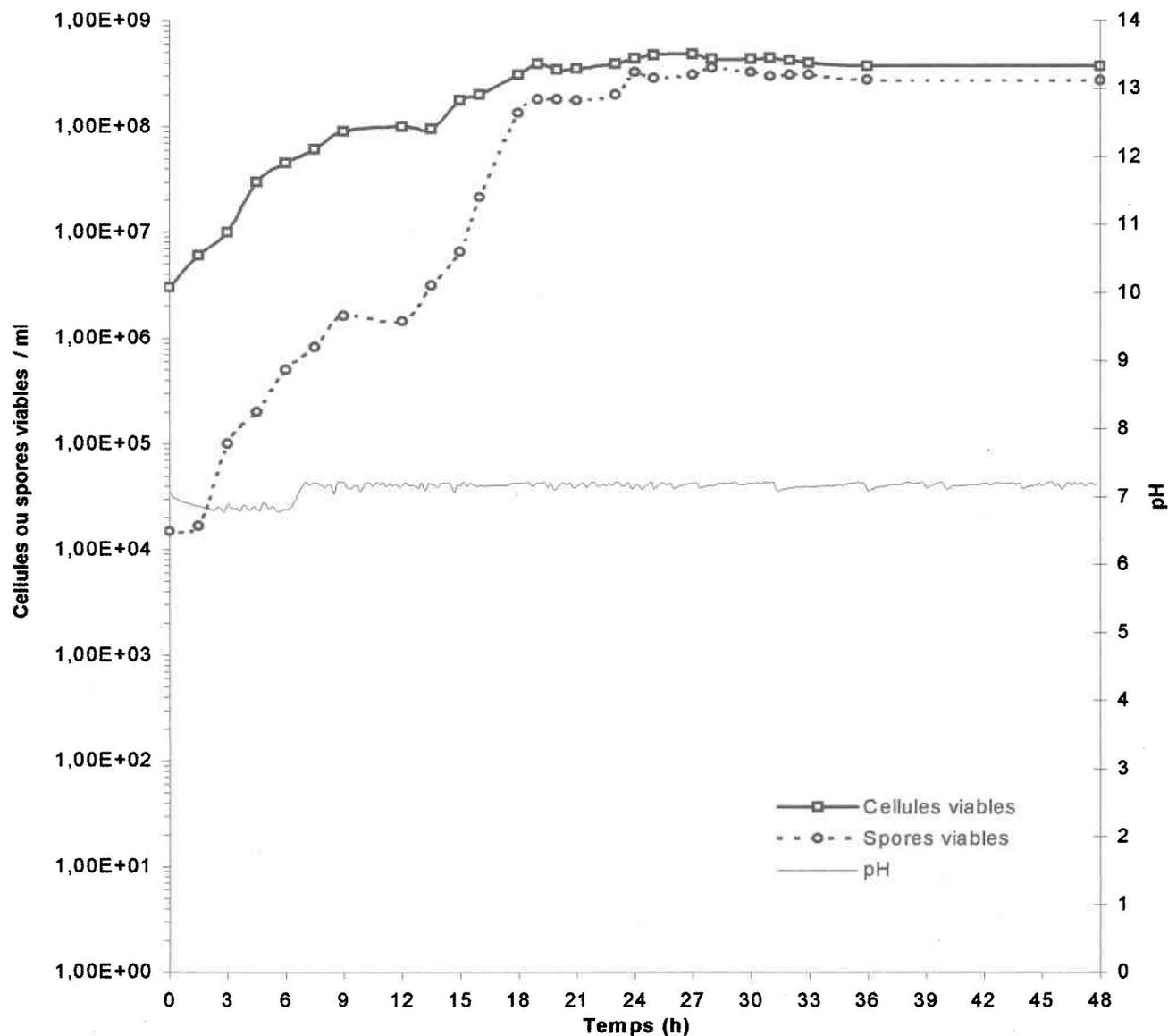
Cette expérience sert de contrôle pour l'ensemble des expériences réalisées dans les bioréacteurs de 15 litres avec les boues secondaires de la CUQ échantillonnées le 23-07-99. Les concentrations de cellules et de spores de Btk obtenues dans les bioréacteurs sont similaires à celles observées dans les fermentations des boues secondaires en erlenmeyers : approximativement de  $3$  à  $5 \times 10^8$  cellules ou de spores viables / ml sont obtenues (tableau 9 et tableau 13). Une faible diminution du nombre de cellules et de spores, du pourcentage de sporulation est observée entre 30 et 48 h de fermentation (figure 15). Les pourcentages de

sporulation changent très peu après 24 h de fermentation alors que l'entomotoxicité atteint son sommet après 36 h de fermentation (tableau 13), mais diminue dans les 12 heures suivantes.

**Tableau 13 :** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A, contrôle.

Temps (hres)	Cellules ( $\times 10^7$ ) / ml		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité UI $\times 10^3$ / $\mu$ l
	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	
24	43,5	3,5	32,5	2,6	74,7	6,0	10,3
30	43	3,4	32,5	2,6	75,6	6,0	10,8
36	37	3,0	27,5	2,2	74,3	5,9	11,7
48	37	3,0	27	2,2	73,0	5,8	10,3

La figure 15 montre la croissance de Btk lors de la fermentation de boues secondaires à pH 7 contrôlé. La croissance cellulaire est similaire à la figure 7 à l'exception du taux de croissance qui est légèrement plus faible (0,26/h). La phase d'adaptation de Btk dans les boues secondaires est très courte et la phase exponentielle de croissance débute après une heure de fermentation et se termine après 18 h de fermentation, période pour laquelle le taux de croissance a été calculé. Une seconde phase d'adaptation est observée après 9 h de fermentation. Une période de croissance lente après 9 h de fermentation suggère la présence d'une seconde phase d'adaptation. La sporulation commence très tôt après 1-3 h de fermentation et se stabilise après 9 h de fermentation. La croissance cellulaire est aussitôt reprise après 13 h de fermentation et la sporulation continue après 12 h. La phase stationnaire de croissance commence après 18 h de fermentation. De bons pourcentages de sporulation sont obtenus au-delà de 24 h de fermentation, souvent plus de 70% (voir tableau 31, Annexe-6).



**Figure 15:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk lors d'une fermentation de 48 heures dans un bioréacteur (15 L) contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99) à pH 7, 30°C, 300-500 rpm et  $\geq 20\%$  d'oxygène dissous. Expérience A. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,26/h.

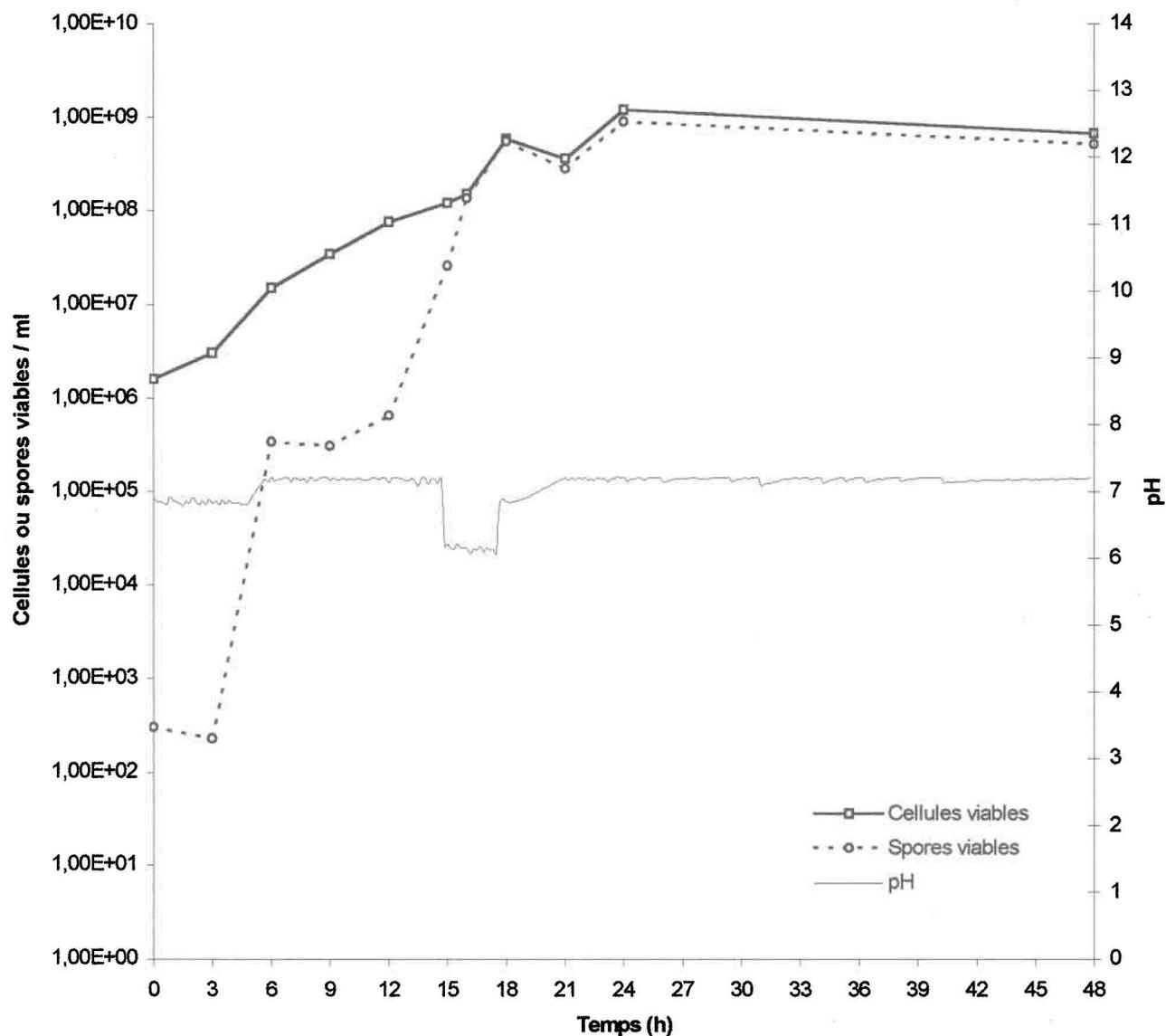
### 3.5.2 Un choc de pH acide

Une forte croissance cellulaire et un nombre élevé de spores sont obtenus lorsqu'un choc de pH de 7 à 6 d'une durée de trois heures est appliqué après 15 h de fermentation. Une diminution considérable du nombre de cellules viables et de spores entre 24 et 48 h de fermentation est observée (tableau 14, figure 16). L'entomotoxicité ne change pas entre 24 et 48 h de fermentation. De plus, le pourcentage de sporulation change très peu avec 77% après 48 h par rapport à 74,7% avec le contrôle.

**Tableau 14 :** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience B, pH 7->6->7 (15-18 h).

Temps (hres)	Cellules ( $\times 10^7$ ) / ml		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
	moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%)
24	120,0	9,6	90,0	7,2	75,0	6,0	10,5	1,9
48	67,5	5,4	52,0	4,2	77,0	6,2	10,6	2,8

Le tableau 15 et la figure 16 montrent que Btk a réagi au choc de pH en atteignant un pourcentage de sporulation de 90% une heure après son application (T=16) et reste dans cet ordre de grandeur avant que le pH soit rétabli à 7 (T=18). De plus, le nombre de spores augmente significativement après trois heures de choc acide à pH 6, passant de 2,6 à  $55,5 \times 10^7$  spores/ml. La figure 15 illustre très bien la réaction de Btk sporulant abondamment dans l'heure qui suit l'application du choc de pH. Entre T=24 et T=48, une diminution de cellules viables et de spores est constatée sans pour le moins modifier le taux de sporulation. Un taux de croissance plus élevé (0,34/h) que le contrôle (0,26/h) est aussi observé. Finalement, les dénombrements cellulaires et sporaux sont faibles au T=21 et ne semblent pas correspondre aux valeurs exactes des dénombrements à ce temps précis.



**Figure 16:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application d'un choc de pH 7->6->7 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm et  $\geq 20\%$  d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience B. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,34/h.

**Tableau 15** : Dénombrements des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 25-07-99) en erlenmeyer. Expérience B (pH 7->6->7, 15-18 h) en comparaison avec A (contrôle).

Expérience	T $\sigma$	Avant choc				T (h)	Après choc			
		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)			Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)	
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$
A	15	0,7	0	3,7	0,3	16	2,15	0,2	10,8	0,9
						18	13,5	1,1	43,5	3,5
B	15	2,6	0,2	21,7	1,7	16	13,5	1,1	90,0	7,2
						18	55,5	4,4	93,3	7,5

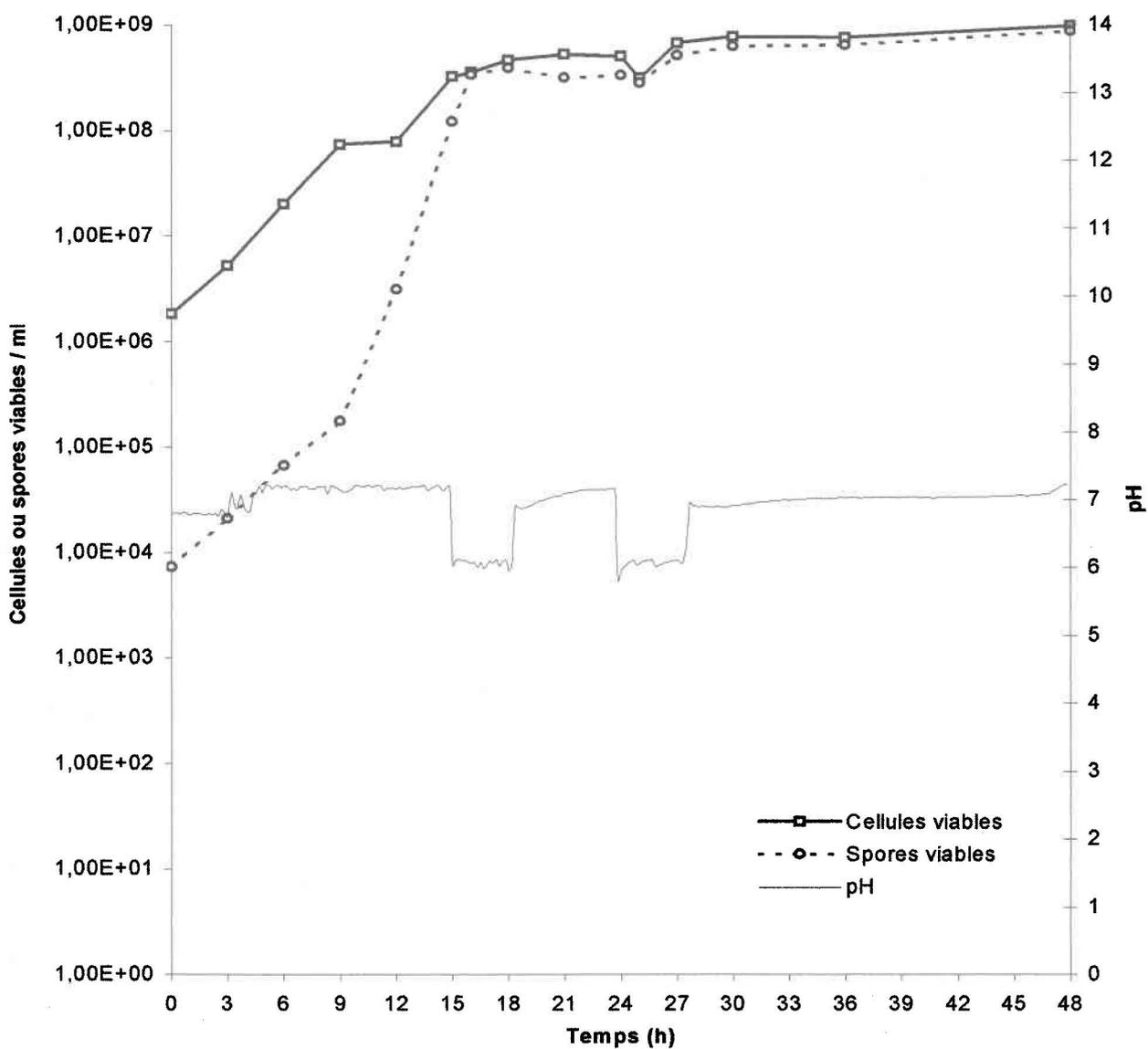
### 3.5.3 Plusieurs chocs de pH acides

Compte tenu des bons résultats obtenus lors de l'application d'un choc de pH durant la fermentation des boues secondaires par Btk (expérience B), un second choc du même type a été proposé et effectué dans une autre expérience en bioréacteur (expérience C) afin de déterminer si les effets d'un premier choc peuvent être cumulés à ceux d'un second choc. Une forte biomasse cellulaire et sporale a été obtenue après 24 h de fermentation et contrairement au contrôle, elle a continué à augmenter jusqu'aux dernières heures de l'expérience pour atteindre approximativement  $1 \times 10^9$  cellules et de spores viables par ml (tableau 16). Après 24 h de fermentation, le nombre de cellules viables et de spores n'est pas aussi élevé dans l'expérience C que dans l'expérience B, mais il est toujours plus élevé que le contrôle au même temps. Un choc de pH 7->6->7 entre 15 et 18 h de fermentation augmente le nombre de cellules et de spores. Le second choc de pH 7->6->7 entre 24 et 27 h de fermentation a augmenté aussi le nombre de cellules et de spores et a permis l'obtention d'une forte toxicité après 30 h de fermentation. De plus, des pourcentages de sporulation au-dessus de 80% ont été obtenus dans les temps suivant l'application du deuxième choc. Toutefois, l'entomotoxicité a diminué après 30 h de fermentation. Comme la figure 16, la figure 17 montre la réaction de Btk qui sporule rapidement dans l'heure suivant le premier choc de pH passant de  $1,2$  à  $3,35 \times 10^8$  spores/ml avec un pourcentage de sporulation de 37,5 à 97,5% (tableau 17). Par contre, le nombre de spores après 15 h de fermentation était très élevé par rapport au contrôle et l'augmentation n'est pas aussi importante que l'expérience B. Dans l'heure suivant l'application du deuxième choc (T=25), la

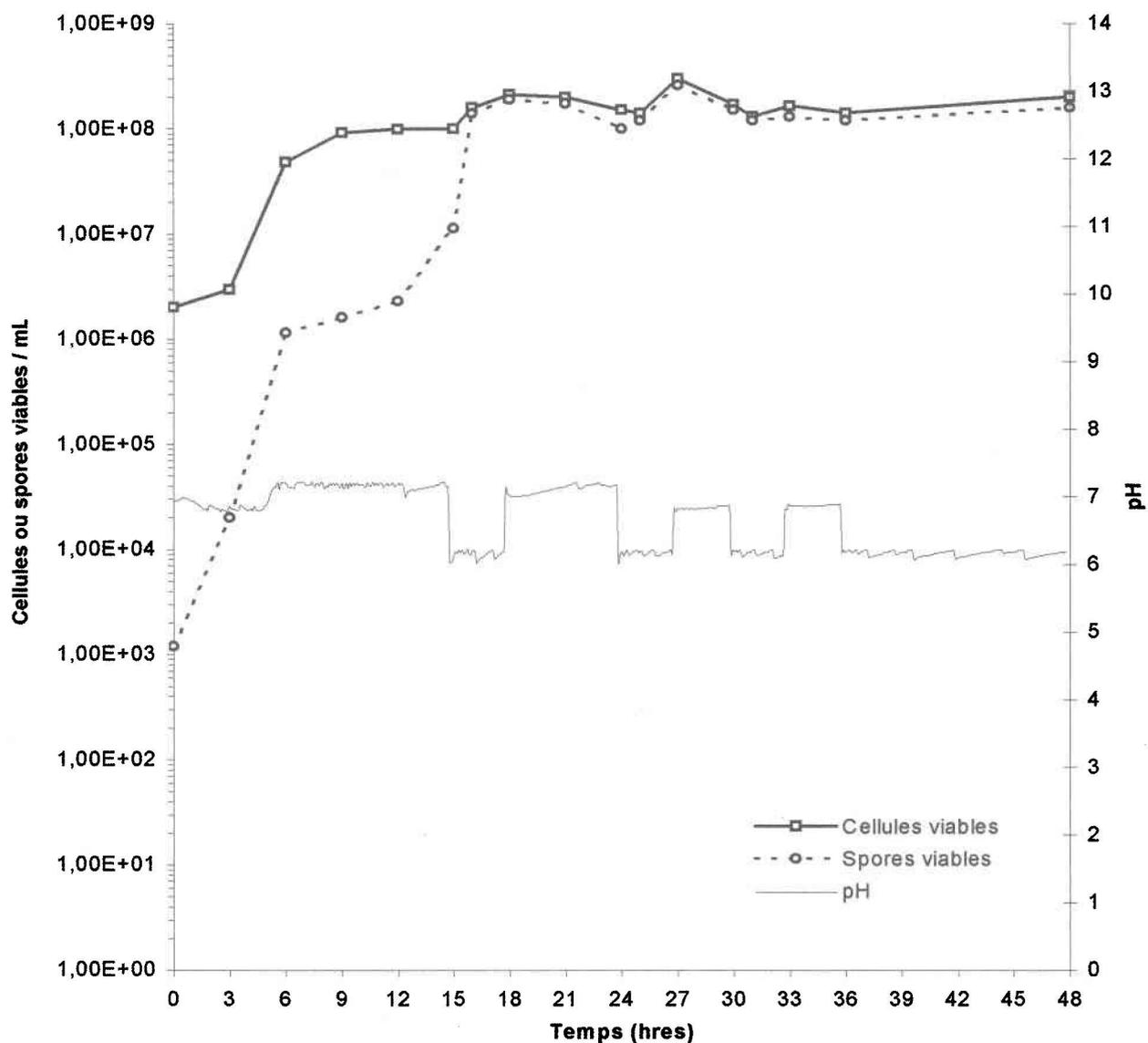
figure 17 montre une nette diminution des dénombrements de cellules viables ainsi qu'une faible diminution du nombre de spores viables de  $3,3$  à  $2,8 \times 10^8$  spores/ml (tableau 17). Finalement, une augmentation du nombre de cellules viables est observée sur la figure 17 à la fin du deuxième choc de pH ainsi qu'une augmentation des spores de  $2,8$  à  $5,1 \times 10^8$  spores/ml comme il est mentionné dans le tableau 17.

**Tableau 16:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A : contrôle, pH 7. Expérience C: pH 7->6->7 (15-18, 24-27 h) ; expérience D: pH 7->6->7 (T=15-18, 24-27, 30-33 h) et pH 7->6 (T=36-48 h) ; expérience E: pH 7->6->7 (T=15-16, 19-20, 23-24, 27-28, 31-32 h) et pH 7->6 (T=36-48 h).

Expériences	T (h)	Cellules ( $\times 10^7$ ) / ml		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI $\times 10^3$ / $\mu$ l	$\neq$ (%)
A	24	43,5	3,5	32,5	2,6	74,7	6,0	10,3	x
	30	43	3,4	32,5	2,6	75,6	6,0	10,8	x
	36	37	3,0	27,5	2,2	74,3	5,9	11,7	x
	48	37	3,0	27	2,2	73,0	5,8	10,3	x
C	24	50,0	4,0	33,0	2,6	66,0	5,3	11,9	15,3
	30	76,0	6,1	62,0	5,0	81,6	6,5	12,7	17,7
	36	74,5	6,0	63,5	5,1	85,2	6,8	11,8	1,5
	48	97,0	7,8	86,0	6,9	88,7	7,1	11,4	11,6
D	24	15,0	1,2	10,0	0,8	66,7	5,3	9,2	-10,6
	30	17,0	1,4	15,0	1,2	88,2	7,1	12,0	11,4
	36	14,0	1,1	12,0	1,0	85,7	6,9	10,8	-7,7
	48	20,0	1,6	16,0	1,3	80,0	6,4	11,6	12,9
E	24	40,0	3,2	38,0	2,3	95,0	5,0	10,9	8,0
	30	35,0	2,8	27,0	2,2	77,1	6,2	12,8	18,9
	36	36,0	2,9	34,5	2,8	95,8	4,2	11,8	1,0
	48	28,0	2,2	23,0	1,8	82,1	6,6	10,3	0,3



**Figure 17:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH 7->6->7 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, à 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et  $\geq 20\%$  d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience C. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,36/h.



**Figure 18:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de trois chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience D. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,35/h.

Les effets de deux chocs de pH sur la croissance et la sporulation de Btk dans les boues secondaires ont été étudiés (expérience C). Une autre expérience du même genre a été réalisée, mais avec quatre chocs au lieu de deux (expérience D). Dans ce cas-ci, la croissance cellulaire et le nombre de spores sont plus faibles que le contrôle pour tous les temps de fermentation échantillonnés (tableau 37, Annexe-9). L'entomotoxicité est faible après 24 h et forte après 30 h de fermentation (tableau 16). Entre 30 et 36 h, l'entomotoxicité diminue pour ensuite augmenter vers la fin de l'expérience. Le premier choc entraîne une augmentation du nombre de spores une heure après son application (tableau 18). Un fort pourcentage de sporulation est aussi obtenu, passant de 11,4% à 85,7% et atteignant 90,5% à la fin de ce choc. Comme les figures 16 et 17, la figure 18 montre une augmentation significative de spores une heure après le premier choc.

**Tableau 17:** Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience C (pH 7->6->7, 15-18 et 24-27 h) en comparaison avec A (contrôle).

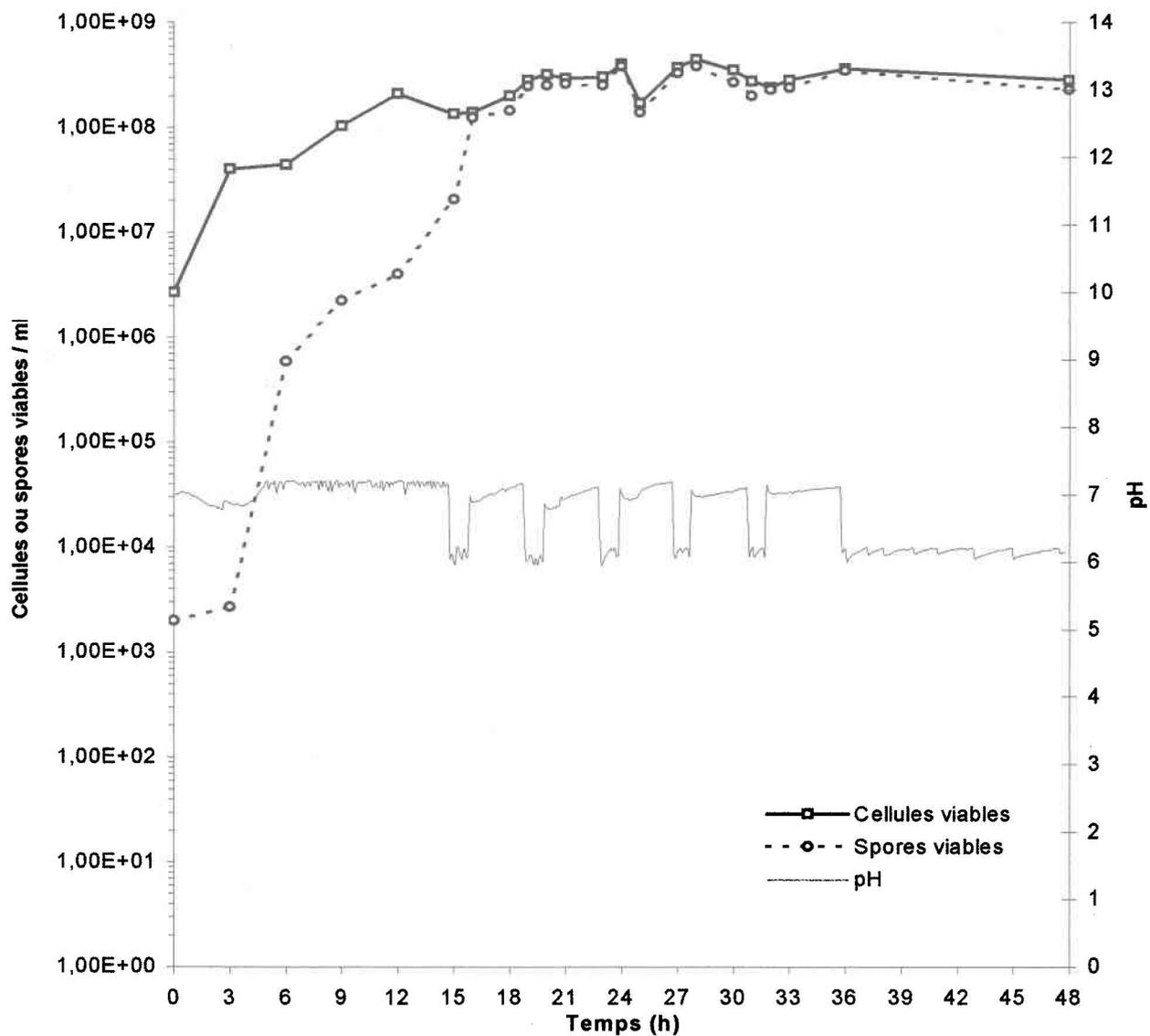
Expérience	T (h)	Avant choc				Après choc				
		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		Spores $\times 10^7$ / ml		Sporulation (%)		
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	
A	15	0,7	0,1	3,7	0,3	16	2,2	0,2	10,8	0,9
						18	13,5	1,1	43,5	3,5
	24	32,5	2,6	74,7	6,0	25	28,5	2,3	60,6	4,8
						27	31	2,5	64,6	5,2
C	15	12	1,0	37,5	3,0	16	33,5	2,7	95,7	7,7
						18	39,0	3,1	84,8	6,8
	24	33	2,6	66,0	5,3	25	28,0	2,2	90,3	7,2
						27	51,0	4,1	76,1	6,1

Entre le premier et le deuxième choc de l'expérience D, le nombre de cellules et celui des spores viables diminuent (figure 18 et tableau 18). Une heure après le début du deuxième choc, le pourcentage de sporulation augmente sans qu'il y ait de changement considérable dans le nombre de spores. C'est à la fin du deuxième choc qu'une augmentation significative du nombre de spores est observée avec un taux de sporulation constant. Encore une fois, une diminution des cellules et des spores viables entre deux chocs est observée avant l'application du troisième choc au T=30. À ce temps, l'entomotoxicité est élevée (tableau 16). Une diminution du nombre de

spores est constatée une heure suivant le troisième choc et accompagnée par une diminution du taux de sporulation à la fin du choc (tableau 18). De plus, durant et après l'application du troisième choc, l'entomotoxicité diminue considérablement. Le quatrième et dernier choc entraîne une légère augmentation du nombre de cellules, de spores et de l'entomotoxicité (tableaux 16 et 18).

**Tableau 18:** Dénombrements des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience D (pH 7->6->7 de 15-18, 24-27 et 30-33 h, pH 7->6 de 36-48 h) en comparaison avec A (contrôle).

Expérience	T (h)	Avant choc				Après choc				
		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	
A	15	0,7	0,1	3,7	0,3	16	2,15	0,2	10,8	0,9
						18	13,5	1,1	43,5	3,5
	24	32,5	2,6	74,7	6,0	25	28,5	2,3	60,6	4,8
						27	31,0	2,5	64,6	5,2
	30	32,5	2,6	75,6	6,0	31	30,0	2,4	68,2	5,5
						33	31,0	2,5	77,5	6,2
36	27,5	2,2	77,3	6,2	48	27,0	2,2	73,0	5,8	
D	15	1,1	0,1	11,4	0,9	16	14,0	1,1	85,7	6,9
						18	19,0	1,5	90,5	7,2
	24	10	0,8	66,7	5,3	25	12,0	1,0	85,7	6,9
						27	26,0	2,1	86,7	6,9
	30	15	1,2	88,2	7,1	31	12,0	1,0	92,3	7,4
						33	13,0	1,0	78,8	6,3
36	12	1,0	85,7	6,9	48	16,0	1,3	80,0	6,4	



**Figure 19:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de cinq chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, à 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99). Expérience E. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,35/h.

L'effet de plusieurs chocs de courte durée a aussi été étudié dans l'expérience E (figure 19). Après 24 h de fermentation où trois chocs ont déjà été effectués, le nombre de cellules et de spores est similaire au contrôle (tableau 16). La croissance cellulaire et le nombre de spores diminuent entre T=30 et T=48. Le premier choc appliqué favorise la sporulation de Btk comme ceux appliqués précédemment dans les expériences B, C et D. Il n'y a pas de changement dans le nombre de spores durant et après le deuxième choc (tableau 19). Dans la figure 19, l'augmentation du nombre de spores s'effectue plutôt avant le deuxième choc. Btk réagit au troisième choc de pH en augmentant son nombre de spores de  $2,5$  à  $3,8 \times 10^8$  UFC/ml et son taux de sporulation de 83,3 à 95 %. Une légère augmentation du nombre de spores s'observe après le quatrième choc, mais durant les deux heures suivantes, les concentrations en cellules viables et en spores diminuent considérablement (figure 19 et tableau 19). Le cinquième choc entraîne une augmentation du taux de sporulation de 72,7 à 95,8%. Dans les quatre heures suivant le cinquième choc, la concentration en spores atteint  $3,45 \times 10^8$  spores/ml et un taux de sporulation élevé est

**Tableau 19:** Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience E (pH 7->6->7 de 15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h ainsi que pH 7->6 de 36-48 h) en comparaison avec A (contrôle).

Expérience	Avant choc					Après choc				
	T	Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		T	Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)	
	(h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	(h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$
A	15	0,7	0,06	3,7	0,3	16	2,2	0,2	10,8	0,9
	19	18,0	1,4	46,2	3,7	20	18,0	1,4	52,2	4,2
	23	20,0	1,6	51,3	4,1	24	32,5	2,6	74,7	6,0
	27	31,0	2,5	64,6	5,2	28	36,0	2,9	83,7	6,7
	31	30,0	2,4	68,2	5,5	32	31,0	2,5	73,8	5,2
	36	27,5	2,2	74,3	5,9	48	27,0	2,2	73	5,8
E	15	2,1	0,2	15,2	1,2	16	12,5	1,0	89,3	7,1
	19	24,5	2,0	87,5	7,0	20	25,0	2,0	78,1	6,2
	23	25,0	2,0	83,3	6,7	24	38,0	3,0	95,0	7,6
	27	33,0	2,6	89,2	7,1	28	38,0	3,0	86,4	6,9
	31	20,0	1,6	72,7	5,8	32	23,0	1,8	95,8	7,7
	36	34,5	2,8	95,8	7,7	48	23,0	1,8	82,1	6,6

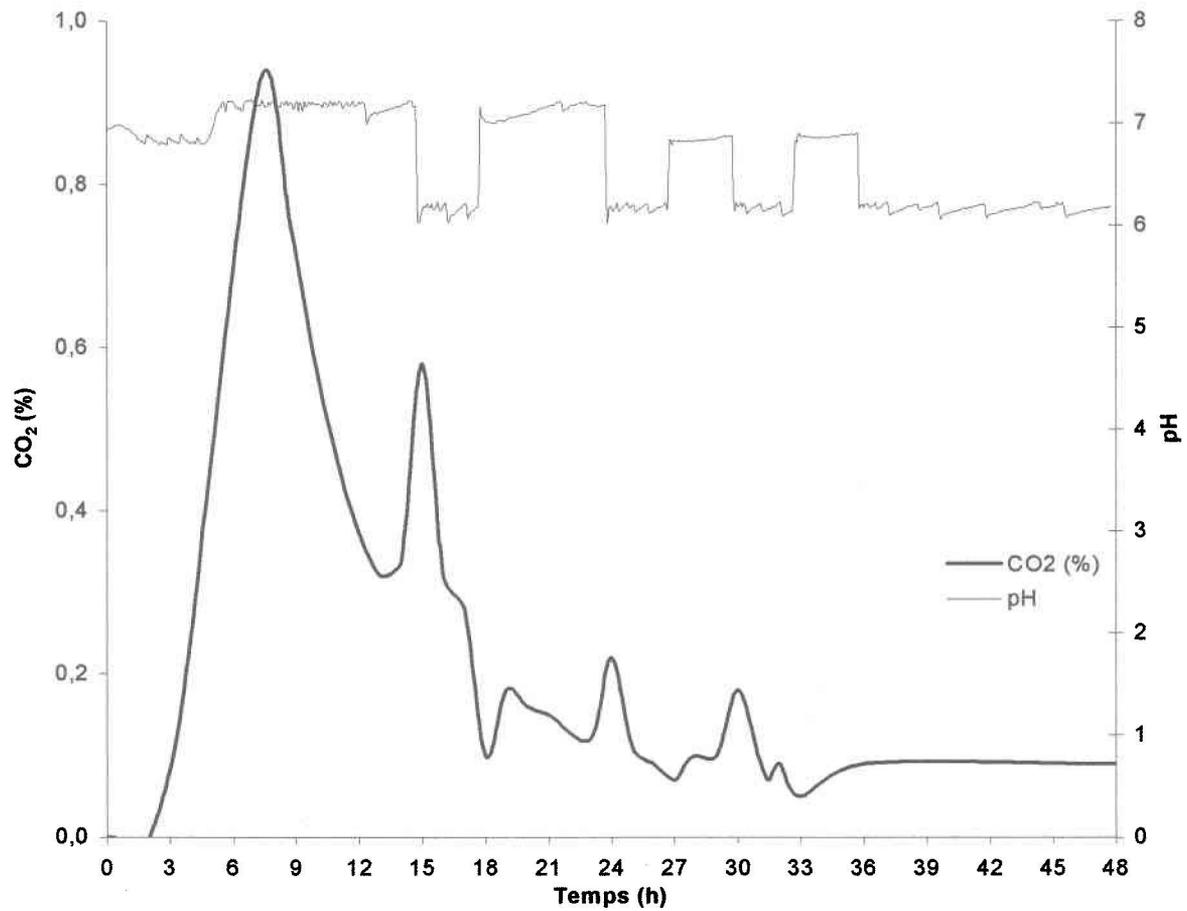
conservé. L'application du dernier choc diminue le nombre de spores et de cellules viables ainsi que le taux de sporulation (tableau 19). Une forte entomotoxicité est atteinte après 30 h de fermentation pour alors diminuer considérablement dans les six heures suivantes (T=36), période où le cinquième choc a été réalisé (tableau 16).

Finalement, les taux de croissance de 0,36/h et de 0,35/h, plus élevés que celui du contrôle (0,26/h), sont obtenus pour les expériences C (figure 17) et E (figure 19) respectivement. Cependant, le taux de croissance de l'expérience D (figure 18) est identique à celui du contrôle.

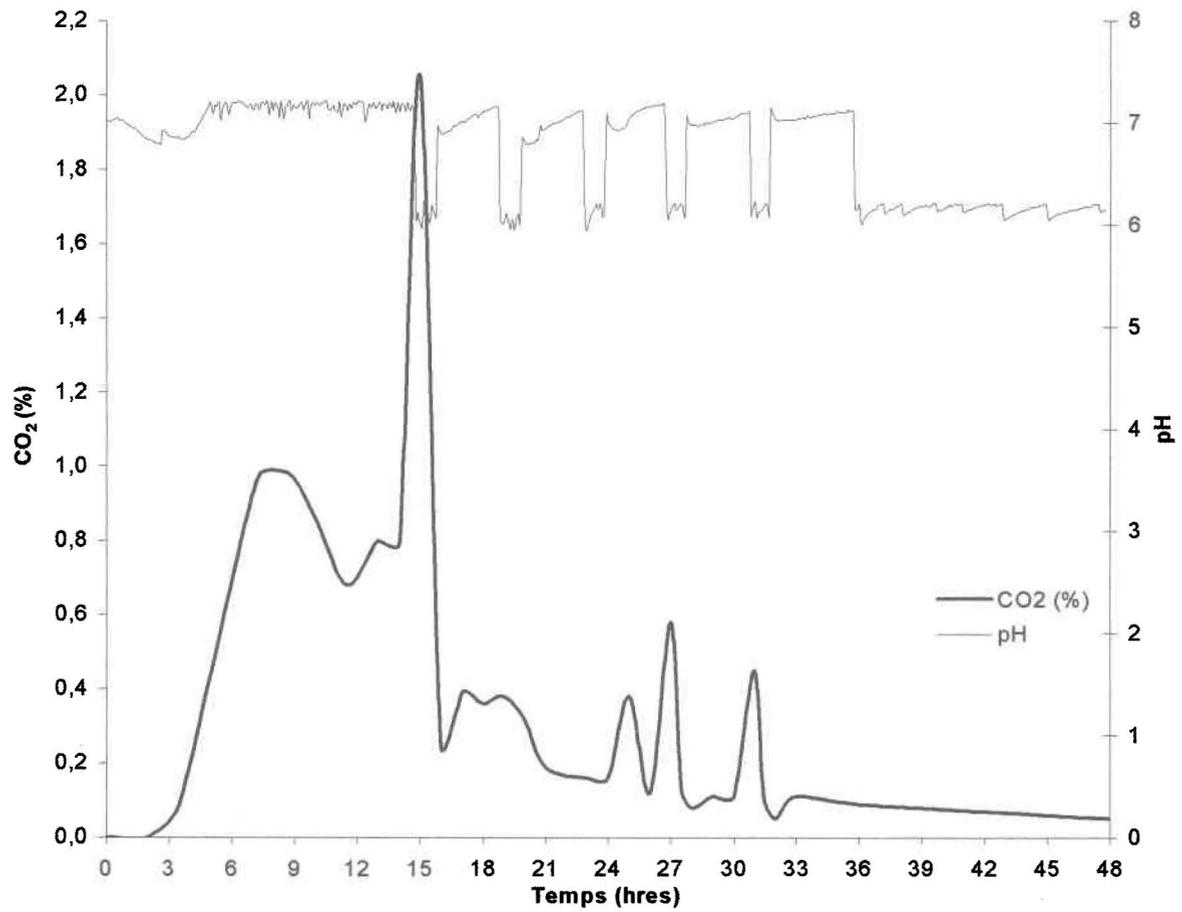
### 3.5.4 Évolution du CO<sub>2</sub> durant les chocs de pH

Pour les expériences D et E, l'analyse du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) a été réalisée efficacement afin de percevoir si le métabolisme bactérien est actif lors des chocs de pH. Dans l'expérience D (figure 18), la première augmentation du CO<sub>2</sub> est observée aux premières heures de la fermentation (figure 20), c'est-à-dire, au début de la phase exponentielle de croissance. La première diminution du CO<sub>2</sub> correspond au début de la phase stationnaire et le commencement de la sporulation. Dans l'heure suivant le premier choc de pH, une augmentation du CO<sub>2</sub> est constatée. Le CO<sub>2</sub> diminue jusqu'à ce que le choc soit complété. Le même phénomène est observé pour le deuxième et le troisième chocs. Aucun changement dans la concentration du CO<sub>2</sub> n'est observé lorsque le pH est ajusté à 6 à la fin de la fermentation.

Pour ce qui est de l'expérience E (figure 21), le CO<sub>2</sub> augmente durant la phase exponentielle de croissance, le premier, le deuxième, le quatrième et le cinquième choc (figure 21). Il n'y a pas de changement de CO<sub>2</sub> avant et durant le troisième choc, mais une augmentation du CO<sub>2</sub> est constatée tout juste après. Le dernier choc de pH n'influence pas la concentration du CO<sub>2</sub> dans le milieu pour les dernières heures de fermentation.



**Figure 20:** Suivi du CO<sub>2</sub> après l'application de trois chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures (expérience D) à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99).



**Figure 21:** Suivi du CO<sub>2</sub> après l'application de cinq chocs de pH 7->6->7 et un de pH 7->6 lors d'une fermentation de 48 heures (expérience E) à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires (CUQ 23-07-99).

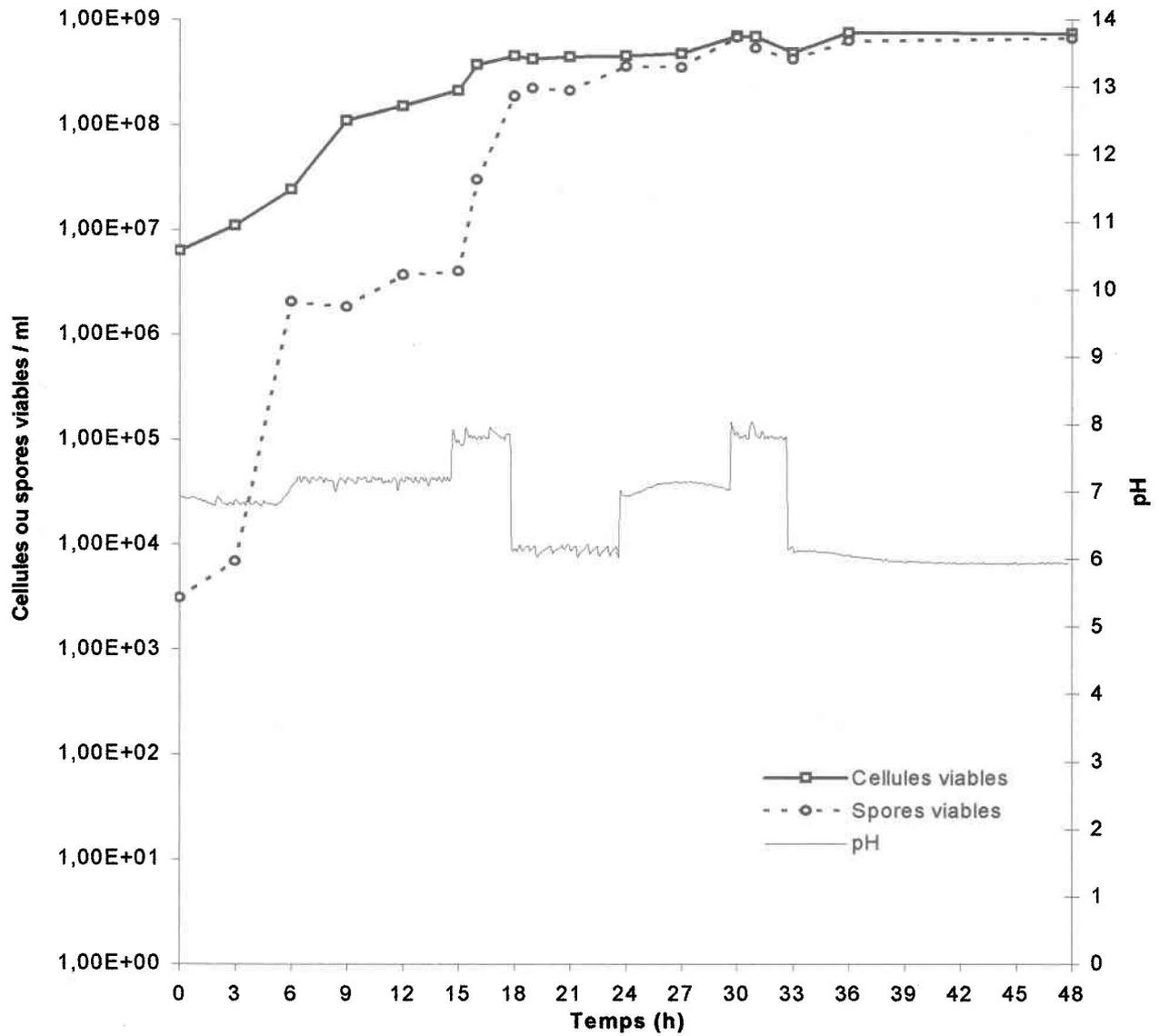
### 3.5.5 Plusieurs chocs de pH basiques et acides

Les expériences préliminaires en erlenmeyers impliquant des chocs de pH basiques ont donné des résultats intéressants et ont été appliquées dans les bioréacteurs. Le tableau 20 indique que de hautes concentrations en cellules viables et en spores ainsi que de fortes entomotoxicités ont été obtenues au courant des expériences F et G.

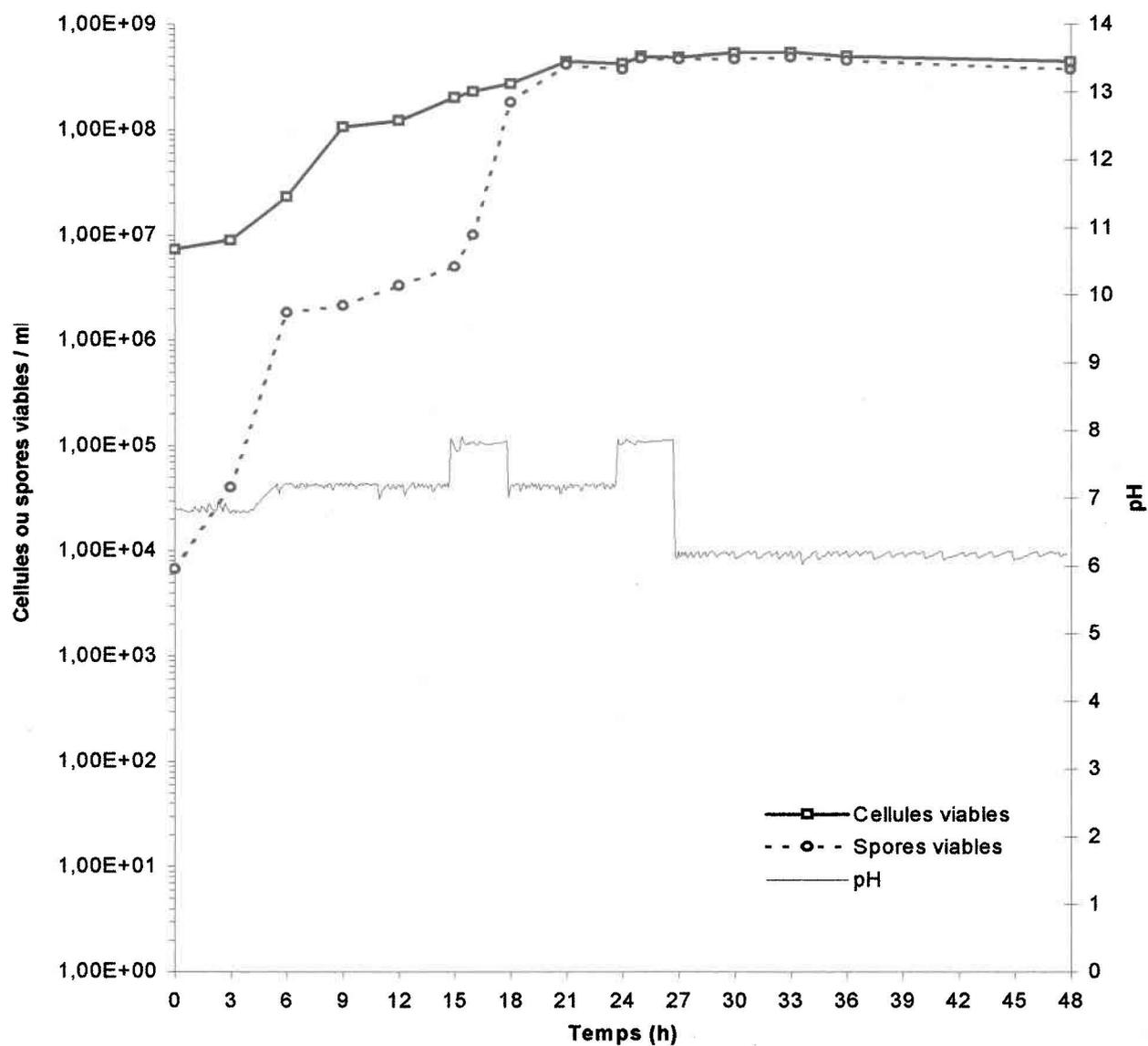
Dans l'expérience F (figure 22), l'entomotoxicité augmente avec le temps de fermentation alors que le phénomène inverse a souvent été observé dans les expériences précédentes (A, B, C et E). Une augmentation considérable de l'entomotoxicité est observée après l'application de deux chocs de pH basiques-acides (tableau 20). De plus, la concentration en spores du produit final est supérieure à celle obtenue dans le contrôle.

**Tableau 20:** Dénombrement des cellules et des spores viables et évaluation du taux de sporulation ainsi que l'entomotoxicité après l'application de plusieurs chocs de pH lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience A : contrôle, pH 7 ; expérience F: pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h) ; expérience G: pH 7->8->7 (T=15-18 h) et pH 7->8->6 (24-27-48 h).

Expérience	T (h)	Cellules x10 <sup>7</sup> / ml		Spores x10 <sup>7</sup> / ml		Sporulation (%)		Entomotoxicité	
		moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type	UI x 10 <sup>3</sup> / µl	≠ (%)
A	24	43,5	3,5	32,5	2,6	74,7	6,0	10,3	x
	30	43	3,4	32,5	2,6	75,6	6,0	10,8	x
	36	37	3,0	27,5	2,2	74,3	5,9	11,7	x
	48	37	3,0	27	2,2	73,0	5,8	10,3	x
F	24	45,0	3,6	36,0	2,9	80,0	6,4	11,2	8,8
	30	69,0	5,5	67,0	5,4	97,1	3,9	11,5	6,5
	36	74,5	6,0	42,0	3,4	87,5	7,0	12,7	8,7
	48	73,0	5,8	66,0	5,3	90,4	7,2	13,1	28,1
G	24	42,0	3,4	37,0	3,0	88,1	7,0	11,9	14,7
	30	53,0	4,2	46,5	3,7	87,7	7,0	13,1	21,0
	36	49,5	4,0	45,0	3,6	90,9	7,3	12,5	7,1
	48	44,0	3,5	37,0	3,0	84,1	6,7	11,7	14,3



**Figure 22:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et ≥ 20% d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires CUQ (23-07-99). Expérience F. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,23/h.



**Figure 23:** Dénombrement des cellules et des spores viables de Btk après l'application de deux chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de 48 heures à 30°C, 300-500 rpm, 5-15 litres d'air par min. et  $\geq 20\%$  d'oxygène dissous dans un bioréacteur de 15 L contenant 10 L de boues secondaires CUQ (23-07-99). Expérience G. Taux de croissance ( $\mu$ ) = 0,22/h.

Le même type d'expérience a été effectué dans l'expérience G (figure 23), mais avec un premier choc de nature basique et a permis l'obtention de 14,7% de plus d'entomotoxicité après 24 h de fermentation par rapport au contrôle. Dans ce cas-ci, l'entomotoxicité suit une évolution semblable aux expériences A, B, C et E où une forte entomotoxicité est obtenue après 30 h de fermentation et diminue dans les heures suivantes (tableau 20). Les deux plus fortes entomotoxicités ont été obtenues dans les expériences F et G, ce qui suggère que des chocs de nature basique ou basique-acide favorisent la production d'endotoxines

**Tableau 21:** Dénombrements des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience F (pH 7->8->6 de 15-18-24 et 30-33-48 h) en comparaison avec A (contrôle).

Expérience	T (h)	Avant choc				Après choc				
		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		
		moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	
A	15	0,7	0,1	3,7	0,3	16	2,2	0,2	10,8	0,9
						18	13,5	1,1	43,5	3,5
						24	32,5	2,6	74,7	6,0
	30	32,5	2,6	75,6	6,0	31	30,0	2,6	75,6	6,0
						33	31,0	2,5	77,5	6,2
						48	22,0	1,8	73,3	5,9
F	15	2,1	0,2	15,2	1,2	16	12,5	1,0	89,3	7,1
						18	25,0	2,0	78,1	6,2
						24	38,0	3,0	95,0	7,6
	30	33	2,6	89,1	7,1	31	38,0	3,0	86,4	6,9
						33	23,0	1,8	95,8	7,7
						48	23,0	1,8	82,1	6,6

La figure 22, appuyée par les valeurs du tableau 21, montre que Btk réagit au premier choc de pH basique-acide en atteignant, une heure après son application (T=16), un pourcentage de 90% et  $1,25 \times 10^8$  spores/ml en comparaison avec 10,8% de sporulation et  $2,27 \times 10^8$  spores/ml pour le contrôle. Un meilleur taux de sporulation est atteint après 24 heures, mais il n'y a pas de différence avec le nombre de spores observé au même temps dans le contrôle (tableau 20). Toutefois, durant l'application du deuxième choc au moment où le pH est basique, le nombre de cellules et de spores viables diminue. Dans les dernières heures de fermentation, une légère augmentation de cellules viables est observée par rapport aux spores et diminue par conséquent le taux de sporulation. Pour l'expérience F (figure 22), un taux de croissance plus faible (0,33/h) que celui du contrôle (0,38/h) a été obtenu.

**Tableau 22:** Dénombrement des spores viables et taux de sporulation avant et après l'application de plusieurs chocs de pH basiques et acides lors d'une fermentation de boues secondaires par Btk (CUQ 23-07-99) en bioréacteur. Expérience G (pH 7->8->7 de 15-18 et pH 7->8->6 de 27-30-48 h) en comparaison avec A (contrôle).

Expérience	Avant choc					Après choc				
	T	Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)		T	Spores ( $\times 10^7$ ) / ml		Sporulation (%)	
	(h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$	(h)	moy.	$\sigma$	moy.	$\sigma$
A	15	0,7	0,06	3,7	0,3	16	2,2	0,2	10,8	0,9
						18	13,5	1,1	43,5	3,5
	24	32,5	2,6	74,7	6,0	25	28,5	2,3	60,6	4,8
						27	31,0	2,5	64,6	5,2
						48	22,0	1,8	73,3	5,9
G	15	0,5	0,04	2,5	0,2	16	1,0	0,08	4,3	0,3
						18	18,0	1,4	66,7	5,3
	24	37,0	3,0	88,1	7,0	25	47,0	3,8	95,9	4,1
						27	46,5	3,7	96,9	3,1
						48	37,0	3,0	84,1	6,7

Encore une fois, Btk réagit favorablement à un choc de nature basique comme il est démontré sur la figure 23 et dans le tableau 22. Toutefois, l'augmentation du nombre de spores et du taux de sporulation est observée à la fin du choc et non une heure après son application comme dans les précédentes expériences (A, B, C, E et F). Après l'application du deuxième choc, la croissance cellulaire et la production de spores augmentent considérablement pour atteindre des pourcentages de sporulation de plus de 90 % avec tout près de  $5 \times 10^8$  spores/ml. Dans les dernières heures de fermentation, une faible diminution du nombre de cellules et de spores viables est observée entraînant une diminution du taux de sporulation. Comme l'expérience F (figure 22), un taux de croissance plus faible (0,22/h) que celui du contrôle (0,26/h) a été obtenu dans l'expérience G (figure 23).



## **4 DISCUSSION**

### **4.1 Fermentation des boues d'épuration par Btk**

Après avoir déterminé les meilleures conditions de fermentation selon la littérature et les expériences des dernières années réalisées par le *Groupe de recherche en Assainissement de l'INRS-eau* (Montiel, 1997), un biopesticide fortement toxique est obtenu en fermentant des boues d'épuration. Qu'elles soient mixtes ou secondaires, les boues permettent la croissance de Btk avec de bons taux de sporulation et de bonnes entomotoxicités, mais n'atteignent pas les valeurs du produit commercial le plus populaire (Foray™). Toutefois, le produit commercial Foray™ est un milieu fermenté qui a été concentré où l'entomotoxicité passe de 1,5-2,1 à  $12,6 \times 10^3$  UI/ $\mu$ l. Les boues d'épuration fermentées peuvent être concentrées, mais pour des questions économiques lors de la production industrielle de ce futur biopesticide, un procédé de concentration des boues n'est pas prévu, puisque l'entomotoxicité obtenue est déjà très élevée.

#### **4.1.1 Comportement de Btk dans les boues d'épuration**

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* croît très bien et produit une forte entomotoxicité dans les boues. Toutefois, les résultats montrent des fluctuations dans les concentrations de cellules et de spores et dans l'entomotoxicité durant les 48 heures de fermentation. Il est bon de déterminer les causes de ces fluctuations afin de les contourner et atteindre le rendement maximal du produit. Les explications sont nombreuses et plusieurs sont abordées dans cette section.

Dans les boues mixtes fermentées en bioréacteur, la croissance de Btk obéit à une courbe de croissance normale où il est possible de déceler le début et la fin de sa phase exponentielle de croissance ainsi que la phase de sporulation. Toutefois, dans les boues secondaires fermentées en bioréacteur, la phase exponentielle de croissance de Btk semble être divisée en deux étapes (figures 7, 15-19, 22 et 23). La première étape constituerait en l'utilisation rapide des sources de carbone et d'azote simples jusqu'à leur épuisement, suivi d'une seconde phase de croissance avec une très faible pente où la bactérie s'adapte à des sources de nutriments plus complexes. La deuxième étape serait liée à l'utilisation lente des sources de carbone et d'azote plus complexes avant le début de la phase stationnaire. À l'exception des figures 7 et 17 où le nombre de spores

augmente normalement, le même phénomène est observé (figures 15, 16, 18, 19, 22 et 23) pour le nombre de spores qui atteint généralement  $1 \times 10^6$  spores/ml durant les premières heures de fermentation pour se stabiliser par la suite et augmenter lentement lorsque les substances complexes sont utilisées pour le métabolisme bactérien. Ce phénomène est appelé diauxie (Pelzcar, 1994), c'est-à-dire, l'épuisement d'une source de carbone facilement assimilable et reprise du métabolisme avec des sources de carbone plus complexes pour la production d'énergie nécessaire à la division cellulaire et à la formation des spores. Dans les milieux contenant plus d'une source de sucres, il est possible d'observer plusieurs phases de croissance (Wayman et Parekh, 1990). La forme de la courbe de croissance des figures 7, 15-19, 22 et 23 suggère donc une seconde phase de croissance. Il est possible aussi que la croissance abondante de Btk au début de la fermentation ait causé une lyse cellulaire prématurée dans la population bactérienne. La production d'enzymes extracellulaires et d'autres métabolites secondaires peut avoir provoqué la lyse de plusieurs jeunes cellules et diminué leur nombre. La croissance cellulaire ne serait pas ralentie durant cette période et la lyse des cellules moins résistantes expliquerait les dénombrements bactériens constants malgré les multiples divisions cellulaires. Cette période prend fin lorsque la quantité de matière organique libérée par la lyse bactérienne est assimilée par les nouvelles cellules pour continuer à croître de façon exponentielle. Finalement, si l'erreur de la méthode d'étalement est appliquée aux résultats avec lesquels ce phénomène est observé, la pente de la courbe peut être plus élevée et rendre peu significative cette observation.

Lors de la fermentation de boues mixtes en bioréacteur, la faible augmentation du nombre de cellules et de spores de Btk durant la phase stationnaire de croissance s'explique par l'utilisation des substances nutritives obtenues des débris des cellules mortes ou des bris de matières en suspension par le brassage continu du milieu. Par contre, durant les fermentations de boues secondaires dans les mêmes conditions (figures 7 et 15), le nombre de cellules et de spores tend à diminuer dans les dernières heures. Le nombre de cellules viables diminue parce que le milieu est épuisé de ses éléments accessibles et que les débris cellulaires ne suffisent pas pour nourrir l'ensemble de la population bactérienne. La diminution du nombre de spores dans les dernières heures de la fermentation peut s'expliquer par leur germination : les métabolites primaires des bactéries ou les débris des cellules mortes pour avoir entraîné la germination de certaines spores. Généralement, la germination des spores entraîne une augmentation des cellules viables, mais

cela n'est pas observé dans les figures 7 et 15. Il est possible que des spores peu résistantes soient mortes ou encore qu'elles aient formé des agrégats avec des particules en suspension. De plus, il se peut que les spores soient adsorbées sur la mousse ou la surface vitrée du bioréacteur.

Les résultats indiquent que l'entomotoxicité diminue après 36 h de fermentation lorsque Btk croît dans des boues secondaires en bioréacteur à pH 7 constant (expérience A). Des diminutions d'entomotoxicité après 30 h de fermentation ont aussi été observées lors de la croissance de Btk dans des boues secondaires provenant de l'usine d'épuration de Jonquièrre (résultats non publiés). Ce phénomène peut être causé par la production de métabolites secondaires comme des protéases qui affectent la structure et l'activité des endotoxines. De plus, les cristaux protéiques peuvent s'adsorber sur les particules en suspension des boues ou encore sur la mousse si elle est abondante dans le bioréacteur. Finalement, étant donné le peu d'études réalisées sur la congélation des échantillons de boues fermentées pour les bioessais et de son influence sur les cristaux protéiques, il est possible que cela ait contribué à la diminution de l'entomotoxicité.

Ainsi, plusieurs facteurs influencent les concentrations de cellules, de spores et d'endotoxines, tout particulièrement l'oxygène, la composition des boues et la disponibilité des éléments. Leur effet est discuté plus en détails dans les prochaines sections.

#### **4.1.1.1 Diffusion de l'oxygène dans les boues d'épuration**

L'oxygène joue un rôle important dans la croissance cellulaire et la sporulation de Btk (Bernhard et Urz, 1993 ; Avignone-Rossa et Mignone, 1992) et cela peut expliquer la différence observée entre la fermentation de boues mixtes (figure 6) et celle réalisée dans les boues secondaires où une plus forte concentration de cellules et de spores est obtenue (figure 7). Un phénomène de transfert de masse impliquant le transfert de l'oxygène aux cellules à partir des bulles et qui dépend surtout de la concentration en solides du milieu (Neilsen et Villadsen, 1994) différencie les boues secondaires des boues mixtes. Les boues secondaires ont des propriétés physiques qui permettent un meilleur transfert de masse de l'oxygène des bulles jusqu'aux cellules : les matières en suspension sont de plus petite taille et le milieu est moins visqueux que les boues mixtes.

L'agitation et l'aération dans les bioréacteur sont aussi très importantes étant donné la difficulté de l'oxygène à diffuser dans les boues d'épuration. Une agitation de 300 rpm tout au long de la fermentation n'est pas suffisante pour conserver plus de 20% d'oxygène dissous. L'oxygène est consommé par Btk aussi rapidement qu'il lui est fourni, surtout en phase exponentielle de croissance où il est nécessaire d'augmenter l'aération de 5 jusqu'à 15 litres d'air par minute et l'agitation entre 400 et 500 rpm. Il est préférable aussi d'augmenter l'agitation dans le bioréacteur avant chaque échantillonnage afin de séparer les cellules et les spores des matières en suspension contenues dans les boues. De plus, le système d'aération du bioréacteur de marque Biogénie® injecte de grosses bulles d'air dans le milieu qui sont plus ou moins brisées lors de leur contact avec les échancrures (« baffles ») sur les bords. Dans un milieu moins complexe que les boues comme le soja, l'agitation et les échancrures permettent de diffuser de petites bulles d'air où l'oxygène est accessible à un plus grand nombre de cellules bactériennes. Il est donc difficile d'avoir une diffusion constante et efficace de l'oxygène dans les boues et cela peut expliquer les fluctuations des courbes de croissances dans les expériences en bioréacteur.

Finalement, les analyses de la concentration en oxygène dissous ont été difficiles à effectuer et leur validité est mise en doute suite aux problèmes d'ajustement de la sonde. Les boues sont un milieu complexe qui demandent l'utilisation de sondes adaptées à leurs conditions difficiles. Pour la fermentation présentée dans la figure 7, le suivi de l'oxygène dissous a été réalisé efficacement. Ce suivi peut être généralisé pour l'autre expérience (figure 15) réalisée dans les mêmes conditions. Malheureusement, il n'est pas possible de commenter l'évolution de l'oxygène dissous durant les chocs de pH. Les suivis de l'oxygène dissous sont annexés à ce document.

#### **4.1.1.2 Effet de la composition des boues**

Les résultats montrent que le nombre de cellules et de spores produites lors d'une fermentation de boues mixtes en bioréacteur est inférieur à celui obtenu dans les boues secondaires dans les mêmes conditions ; la différence dans la composition des boues mixtes diluées et des boues secondaires décantées du 25-06-99 (tableau 3) peut expliquer ces observations. Diluées pour obtenir une concentration en MES de 25 g/L, les boues mixtes sont moins concentrées que les boues secondaires en ce qui concerne tous les paramètres et éléments inorganiques analysés à

l'exception du zinc et du plomb. Les boues secondaires offraient donc une concentration plus élevée d'éléments nutritifs pour la croissance et la sporulation de Btk. De plus, la disponibilité de ces éléments est plus grande dans les boues secondaires que dans les boues mixtes et favorise la croissance et la sporulation de Btk. Cela justifie l'utilisation des boues secondaires pour les expériences en bioréacteur.

La différence de la disponibilité des éléments dans les boues mixtes et secondaires peut expliquer la présence d'une longue phase d'adaptation de Btk dans les boues mixtes (figure 6) malgré la production de l'inoculum dans le même milieu. Cependant, Btk croît aussi rapidement dans les boues mixtes ou secondaires après son adaptation : le taux de croissance de Btk dans les boues mixtes est légèrement différent de celui obtenu dans le premier contrôle dans les boues secondaires (figure 7) et similaire à celui du second contrôle (expérience A, figure 15). Lors de la fermentation de ces deux types de boues, la disponibilité des éléments a donc plus d'influence sur l'adaptation de la bactérie que sur sa croissance cellulaire.

Cependant, les résultats montrent que les entomotoxicités sont semblables lors des fermentations de boues mixtes et secondaires en bioréacteur (tableau 5). Ainsi, un nombre plus élevé de spores comme celui obtenu dans les boues secondaires n'implique pas nécessairement une plus forte entomotoxicité. La synthèse des protoxines et la proportion des séquences entomotoxiques sont contrôlées par l'expression des plasmides, expression qui peut être plus élevée dans un milieu peu propice à la division cellulaire et à la sporulation (Lereclus et al., 1989). L'expression des plasmides est régulée négativement durant la phase végétative de croissance. Alors, dans un milieu où la croissance bactérienne est plus faible comme les boues mixtes, il est possible que l'expression des plasmides soit plus élevée. De plus, les sources d'azote diffèrent dans les deux types de boues et les boues mixtes peuvent contenir une source d'azote particulière et disponible pouvant favoriser la production d'endotoxines ou encore augmenter leur potentiel entomotoxique. Par exemple, la présence d'acides aminés soufrés plus disponibles pour la synthèse protéique peut augmenter l'entomotoxicité du produit (Huber et Lüthy, 1987 ; Rajalakshmi et Shethna, 1977).

Les boues secondaires du 25-06-99 ont été utilisées pour les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> séries d'expériences et celles du 23-07-99 pour la 7<sup>ème</sup> série d'expérience ainsi que les expériences réalisées en

bioréacteur. Celles du 23-07-99 contiennent plus d'azote et moins de carbone, de phosphore et de minéraux. La différence entre les deux boues secondaires peut être expliquée par un échantillonnage après une forte tombée de pluie qui, par le ruissellement, peut entraîner plus de minéraux que normalement, ou encore durant une période de température élevée augmentant celle de l'eau pour une plus grande prolifération microbienne et une utilisation massive des éléments nutritifs disponibles. Le surplus d'azote peut avoir favorisé la production d'endotoxines dans les bioréacteurs et le peu de phosphore ou de minéraux peut avoir limité la croissance. Cependant, aucune expérience avec les boues du 25-06-99 n'a été effectuée en bioréacteur et il est impossible de cerner les véritables effets de cette différence dans la composition des boues.

Finalement, le tableau sur la composition des boues ne donne aucune information sur la disponibilité des éléments inorganiques analysés. Certains peuvent être très concentrés, mais non disponibles pour Btk. Cette remarque sur la disponibilité des éléments est très importante pour comprendre les effets positifs des chocs de pH sur la sporulation et cela est discuté dans la section 4.2.1.

#### **4.1.1.3 Autres facteurs influençant la croissance cellulaire, la sporulation et l'entomotoxicité**

##### **4.1.1.3.1 La mousse**

Durant les fermentations en bioréacteur, une mousse est produite et doit être contrôlée. Les cellules et spores viables peuvent s'y adsorber et cela peut influencer le dénombrement bactérien. La présence d'anti-mousse chimique peut favoriser l'association des spores avec les plus grosses particules en suspension des boues qui ne peuvent pas pénétrer dans la valve d'échantillonnage et rendre les spores inaccessibles aux dénombrements. De plus, à cause de leur surface hydrophobique, les spores libérées ont tendance à se coller à la mousse ou sur les surfaces vitrées (Bernhard et Urz, 1993). Tout cela peut expliquer la diminution de spores observée après 30-36 h en bioréacteur (figures 7, 15, 16, 19 et 23). Cela peut aussi expliquer les faibles dénombrements des temps T=21 dans la figure 16, T=25 dans la figure 17, T=24-25 dans la figure 18 et T=24 dans la figure 19. La mousse peut contenir aussi une forte quantité de métabolites secondaires comme les endotoxines et peut causer une diminution de l'entomotoxicité. Cela pourrait

expliquer les fluctuations de l'entomotoxicité observées dans l'expérience D (tableau 16). Ainsi, il serait préférable de briser la mousse avant chaque échantillonnage. Il faut aussi porter attention à la quantité d'anti-mousse chimique utilisée qui peut réduire le transfert de l'oxygène et influencer la croissance, la sporulation et la production d'endotoxines.

#### **4.1.1.3.2 L'inoculum et le taux de croissance**

L'inoculum de départ est très important pour obtenir une forte biomasse à la fin de la fermentation (Pelmont, 1993a). Dans les figures 6,7,15-23, la concentration de cellules viables au départ se situe près de  $1 \times 10^6$  cellules par ml alors qu'il est préférable d'obtenir une concentration de départ près de  $1 \times 10^5$  cellules par ml à partir d'un inoculum contenant environ  $1 \times 10^8$  cellules par ml. Ainsi, les différences observées dans les divers taux de croissance calculés peuvent s'expliquer par les diverses concentrations de cellules au départ. Par exemple, une plus haute concentration de cellules au départ est observée dans les figures 15, 22 et 23 et cela peut expliquer leur faible taux de croissance. Les hauts taux de croissance des figures 16, 17 et 19 seraient donc expliqués par les plus faibles concentrations de cellules au départ. Il est donc recommandé de préparer l'inoculum dans un erlenmeyer de 1000 ml contenant 100 ml de boues au lieu d'un erlenmeyer de 500 ml avec la même quantité de boues. Il y aurait une meilleure distribution de l'oxygène dans le milieu et l'inoculum atteindra un nombre de cellules satisfaisant en peu de temps.

#### **4.1.2 Comportement de Bt-11 dans les boues d'épuration**

Bt-11 se comporte différemment de Btk dans les boues d'épuration. Ayant été isolée des boues, Bt-11 y est adaptée et croît en abondance dans celles-ci. De plus, elle produit beaucoup de spores. Son processus de sporulation est plus efficace dans les conditions difficiles des boues parce qu'elle est adaptée à la qualité des éléments de ce milieu. Toutefois, dans les boues secondaires, la production des endotoxines semble être défavorisée par son processus de sporulation efficace ou encore par la production privilégiée d'autres métabolites secondaires, souvent plus utiles pour sa survie dans les boues. Cependant, cette dernière explication demande des études plus approfondies pour connaître la nature exacte des métabolites secondaires produits par Bt-11.

Finalement, dans la littérature et les recherches réalisées par le *Groupe de recherche en Assainissement de l'INRS-eau*, les conditions optimales pour la croissance de Bt déterminées jusqu'à maintenant s'adressent tout particulièrement à des souches spécifiques comme Bt var. *kurstaki*, Bt var. *israelensis* et Bt var. *aizawai*. Pour obtenir de meilleurs résultats avec Bt-11, des études plus approfondies sur son comportement dans les boues d'épuration sont donc nécessaires.

## 4.2 Effet des chocs de pH sur la sporulation et l'entomotoxicité

Comme l'avaient observé Salama et al. (1983), un pH de 5,5 ou 5 diminue considérablement la croissance cellulaire, la sporulation ou/et la production de toxines (tableau 6). Dans les figures 16-23, des diminutions et des augmentations de biomasse après l'application des chocs de pH suggèrent que les débris cellulaires des jeunes cellules n'ayant pas survécu aux chocs servent généralement de nutriments pour une nouvelle génération de cellules. Cela se produit tout particulièrement dans l'heure suivant l'application du choc (expériences B-G). Cet effet est plus visible dans l'expérience C (figure 17) où le deuxième choc a éliminé de jeunes cellules pour diminuer le nombre de cellules viables et l'augmenter rapidement dans les deux heures suivantes.

D'après les résultats obtenus, les chocs de pH ont des effets positifs sur la sporulation et la production des endotoxines de Btk. Le pH environnemental influence l'activité enzymatique et la dissociation, ainsi que la solubilité de plusieurs molécules. Il détermine alors la disponibilité des nutriments essentiels et la mobilité des métaux (Atlas et Bertha, 1993). Étant donné que la quantité des éléments nécessaires aux structures du spores peut influencer leur production, alors la disponibilité de ces éléments influence le nombre de spores produites. Ainsi, les résultats positifs des séries d'expériences préliminaires no.1-6 (figures 8-13) et des expériences B, C, E, F et G sur bioréacteur (figures 16, 17, 19, 22 et 23) s'expliquent principalement par l'influence du pH augmentant la disponibilité et le transport des éléments importants à la formation de spores ou d'endotoxines.

### 4.2.1 Influence sur la disponibilité des éléments nécessaires à la sporulation et à la production d'endotoxines

Plusieurs constituants cellulaires comme les protéines, les acides nucléiques, les lipides, les glucides qui contribuent aux fonctions cellulaires comme la synthèse de protéines ou la réplication de l'acide nucléique ont la majorité de leur structure exposée à un environnement aqueux et la concentration en protons peut influencer leur état ionique. Plusieurs de ces composants contiennent des groupements chargés (ex. : COO<sup>-</sup>) qui s'ionisent et se complexent avec des ions et d'autres molécules (Kroll, 1990). En général, un pH acide influence le transport des nutriments avec le mouvement des protons (Gadd, 1990 ; Block et Madigan, 1991 ; Ingledew, 1990). Les éléments utilisés pour la formation du principal constituant de la spore (l'acide dipicolinique ou DPA), c'est-à-dire, l'acide  $\alpha$ -diaminopimélique, le glutamate (précurseur du DPA) ou le CO<sub>2</sub>, peuvent alors être plus accessibles pour la cellule durant la phase de sporulation à pH 6 et sont connus pour influencer positivement la sporulation lorsque leur quantité et leur disponibilité sont plus élevées (Powell et Hunter, 1955). De plus, les éléments inorganiques utilisés pour la stabilité du DPA comme le Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup> et autres éléments inorganiques connus pour favoriser la sporulation (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup>) peuvent être plus accessibles et entrer dans la cellule plus facilement dans leur forme solubilisée à pH acide. Le même phénomène peut être appliqué au phosphore, aux acides aminés, lipides et glucides qui occupent plusieurs parties de la spore et leur accessibilité favorise la sporulation (Murell, 1961). Toutefois, à pH acide, plusieurs formes non ionisées des composants de la sporulation sont dans leur forme ionisée et ne peuvent pas entrer la cellule (Block et Madigan, 1991), mais il semble que cela se produise uniquement dans les dernières heures des expériences au moment où le milieu de fermentation est épuisé de ses nutriments et autres sources facilement assimilables. Finalement, l'accès et le transport des acides aminés et des éléments inorganiques peuvent aussi contribuer à augmenter la production de toxines.

Généralement, la sporulation commence à la fin de la phase exponentielle lorsque les acides organiques sont utilisés pour le métabolisme et que le pH augmente (Lüthy et al., 1982). Ce changement dans le métabolisme induit la synthèse d'enzyme pour la sporulation. Le système ralentit lorsque le pH atteint une valeur de 8. Quand un choc de pH basique est appliqué avant que le pH atteigne normalement la valeur 8, cela active plus rapidement le système enzymatique.

Lorsque le pH est maintenu à 8, il est possible que cela augmente la durée de la phase de sporulation pour donner plus de spores et un meilleur taux de sporulation. Cette explication peut s'appliquer pour le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) qui est actif à la fin de la phase exponentielle de croissance lorsque le pH est basique et qui produit des métabolites pouvant être utilisés comme matériel sporal (Benoît et al., 1990). Le cycle de Krebs n'est pas complet durant la sporulation et produit des enzymes pouvant fabriquer des composants pour la synthèse du DPA (Lüthy et al., 1982 ; Avignone-Rossa et Mignone, 1995). Ainsi, la prolongation des activités métaboliques du cycle de Krebs en maintenant le pH à 8 peut augmenter la production de spores et peut-être même la production d'endotoxines.

Les résultats des expériences reposant sur des chocs de pH de nature basique-acide suggèrent aussi qu'un changement vers un pH acide peut intervenir sur la disponibilité et le transport après un moment de haute synthèse d'enzymes, plus que les expériences avec seulement des chocs de pH de nature acide. Cela peut expliquer la différence entre les expériences F et G. Peu d'explications peuvent être données sur l'influence du pH 8 sur la production d'endotoxines sauf la disponibilité des acides aminés ou encore le prolongement de la phase de sporulation et conséquemment, celle de la production d'endotoxines. La production de métabolites secondaires durant la fermentation débute généralement lorsque le pH devient basique. Dans le cas de Btk, des protéases et des toxines sont produites (Lüthy et al., 1982). Un choc de pH semble favoriser leur production en donnant accès et aidant le transport d'éléments importants ( $\text{Ca}^{2+}$  et acides aminés). Des études plus poussées doivent être réalisées pour savoir comment Btk réagit vraiment aux pH 6 et 8 durant la sporulation. Finalement, les résultats indiquent que plusieurs chocs de pH peuvent causer un stress chez la bactérie en réduisant leur activité métabolique et leur synthèse d'enzymes pour diminuer dans les dernières heures de la fermentation le nombre de cellules et de spores ainsi que l'entomototoxicité. Cependant, les augmentations de  $\text{CO}_2$  après l'application d'un choc suggèrent la reprise des activités métaboliques de la population bactérienne. Ces augmentations peuvent aussi être causées par la plus faible solubilité du  $\text{CO}_2$  à pH acide (Royce, 1992).

En somme, l'induction abiotique de la sporulation chez Btk avec des chocs de pH est possible. L'influence des chocs de pH acides sur la disponibilité des éléments ou des chocs de pH

basiques-acides sur les systèmes enzymatiques favorise la sporulation et dans plusieurs cas, la production d'entomotoxines. Le tableau 23 montre que l'application des chocs de pH permet l'obtention d'un taux de sporulation semblable et une entomotoxicité plus élevée que le plus commercialisé des bioinsectides à base de Btk (Foray™). Cependant, il serait intéressant d'obtenir plus de spores et une augmentation d'entomotoxicité significative avant la commercialisation du procédé de bioconversion des boues d'épuration en biopesticides.

**Tableau 23 :** Comparaison des meilleurs résultats (expérience F) avec un contrôle (expérience A) et la préparation commerciale Foray™.

Substrat de fermentation	Spores $\times 10^7$ / ml	Sporulation (%)	Entomotoxicité (UI $\times 10^3$ / $\mu$ l)
Foray™ (soja)	100	90	12,6
Boues secondaires à pH 7	27	73	10,3
Boues secondaires + chocs de pH	66	90	13,1

#### 4.2.4 Réduction du temps de fermentation

Pour des raisons économiques, le temps de production doit être court et donner le meilleur rendement possible. Certains résultats montrent que le produit atteint son entomotoxicité maximale après 30 h ou 36 h de fermentation avec ou sans choc de pH (expériences A-E et G). La réduction du temps de fermentation est donc envisageable, en passant de 48 h à 30 h ou 36 h de fermentation.

#### 4.2.5 Comportement de Bt-11 vis-à-vis les chocs de pH

Lors de fermentation des boues mixtes, Bt-11 réagit positivement au choc de pH pour les mêmes raisons que Btk. Toutefois dans les boues secondaires, les chocs de pH ont peu d'influence parce qu'ils semblent ne pas avoir été appliqués au début ou durant la phase de sporulation : la concentration en spores était très faible après 15 h et la phase de sporulation semblait être complétée après 24 h de fermentation (tableau 10). Cela indique l'importance qu'il faut accorder au temps de fermentation dans lequel un choc de pH est appliqué. De plus, il est possible que le choc de pH ait favorisé la production de métabolites secondaires ayant des capacités protéolytiques pouvant affecter et diminuer le nombre d'endotoxines. Finalement, comme il a été dit précédemment, les endotoxines ne semblent pas être une priorité dans les métabolites

secondaires produits par Bt-11 au courant de la fermentation. Des études plus précises sur le métabolisme et la nature des métabolites de Bt-11 sont nécessaires pour expliquer son comportement dans les boues d'épuration et déceler l'ordre de priorité qu'elle accorde à ses métabolites secondaires à savoir si elle favorise la production d'enzymes extracellulaires au dépens de celle des endotoxines.

### **4.3 Effets des chocs thermiques sur la sporulation et l'entomotoxicité**

Selon les résultats des chocs thermiques, peu de changements ont été observés en comparaison avec le contrôle à l'exception de l'entomotoxicité qui a diminué. Adbel-Hameed et al. (1991) ont déjà observé une diminution de la toxicité chez Bt var. *israelensis* à 28°C et 33°C. Une explication plausible est la perte du/des plasmides contenant les gènes des entomotoxines durant le choc. Gonzalez et Carlton (1984) ont aussi observé que les hautes températures peuvent causer la perte de plasmides. Ils ont constaté une haute fréquence de perte de plasmides à 43°C. Généralement, pour isoler les plasmides, la suspension bactérienne est mise pendant une heure à 37°C pour libérer le plasmide à l'extérieur de la bactérie (Lewin, 1993), alors qu'une température de 40°C peut entraîner la perte du plasmide durant la croissance ou la sporulation. Si le temps du choc thermique est réduit pour éviter ce phénomène, celui-ci peut ne pas influencer l'entomotoxicité ou la sporulation. Le prolongement du temps du choc thermique peut donner des spores plus résistantes, mais affectera probablement la production de toxines. Finalement, le choc thermique a augmenté la croissance cellulaire comme le laissait présager la littérature sans toutefois influencer la production d'entomotoxines.

## **5 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS**

L'induction abiotique de la sporulation de Bt est possible avec des variations brusques de pH réalisées au début ou durant la sporogénèse. L'application de chocs de pH permet d'obtenir des taux de sporulation de 90 % et des entomotoxicités de plus de  $9,5 \times 10^3$  UI /  $\mu$ l lors de la fermentation de boues secondaires par Btk en bioréacteur. Les chocs de pH favorisent la sporulation et l'entomotoxicité en influençant la disponibilité des éléments nécessaires à la formation des spores et des  $\delta$ -endotoxines. La nouvelle souche Bt-11 se comporte différemment de Btk dans les boues d'épuration et nécessite des études plus approfondies sur ses métabolites secondaires. En ce qui a trait aux chocs thermiques, ils n'induisent pas la sporulation de Bt et peuvent défavoriser la production d'entomotoxines en libérant les plasmides dans le milieu. Les biotechnologies ont maintenant beaucoup d'importance en industrie et l'application des chocs de pH pour l'optimisation des procédés représente un intérêt certain en microbiologie industrielle lors de la production de métabolites secondaires comme les antibiotiques ou les protéases.

Ainsi, la bioconversion des boues d'épuration en biopesticides est possible avec la fermentation de boues d'épuration par Bt. Cependant, l'optimisation n'est pas complète parce que le nombre de spores est inférieur à celui de la préparation commerciale Foray™ : il est toujours possible d'augmenter le nombre de spores avec des facteurs biotiques entraînant alors une hausse de l'entomotoxicité pour l'obtention d'un produit capable de rivaliser dans le monde des insecticides. Il serait intéressant de bien déterminer la relation entre le nombre de spores et les entomotoxines afin d'élaborer une façon de détourner l'énergie utilisée pour la formation des spores vers celle utilisée pour la synthèse d'entomotoxines. Une attention particulière doit être portée à l'inoculum afin de débiter la fermentation avec  $1 \times 10^5$  cellules / ml et terminer avec plus de  $1 \times 10^9$  cellules / ml. La mousse doit aussi être minimisée durant la fermentation en modifiant régulièrement l'agitation et l'aération sans ajouter d'anti-mousse chimique supplémentaire. Finalement, le rendement maximal du produit peut s'obtenir après 30 ou 36 heures et une réduction du temps de fermentation est recommandée. Compte tenu des bons résultats obtenus en bioréacteur de 15 L, le passage à l'étape de la mise à l'échelle en bioréacteur industriel de 150 L pour la commercialisation du procédé est envisageable.



## 6 RÉFÉRENCES CITÉES

Abdel-Hammed, A., G. Carlberg et O. M. El-tayeb. 1991. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-IV. Characterization of fermentation conditions for  $\delta$ -endotoxin production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 7 : 231-236.

APHA, AWWA et WPCF (éds). 1989. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 17<sup>nd</sup> edition*. American Public Health Association, Washington, Etats-Unis.

Aronson, A. I., W. Beckman et P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, 50 (1) : 1-24.

Atlas, R. M. et R. Bartha. 1993. *Microbial Ecology : Fundamentals and Applications, 3<sup>rd</sup> edition*. Addison-Wesley Publishing Company, Ontario., Canada, 563 p.

Avignone-Rossa, C. et C. F. Mignone. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 : 301-304.

Avignone-Rossa, C. et C. F. Mignone. 1995. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. *Mol. Biotechnol.*, 4 : 55-71.

Benoît, T. G., G. R. Wilson et C. L. Baugh. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10 : 15-18.

Bernhard, K. et R. Utz. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* for experimental and commercial uses. In : Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey et S. Higgs (éds), *The Bacillus Thuringiensis, An Environnement Biopesticide, Theory & Practice*, Johns Wiley & Sons Ltd, New York, États-Unis, pp. 256-267.

- Beskid, G. et D. G. Lundgren. 1961. Biochemical changes occurring in a minimal medium during growth and sporulation : comparaison of asporogenic *Bacillus cereus* with asporogenic mutants. *Can. J. Microbiol.*, 7 : 543-551.
- Blais, J.-F. 1999. *Assainissement des eaux usées*. INRS-eau, Université du Québec. Chapitres 6-11.
- Bond, R. P. M. et C. B. C. Boyce. 1971. The thermostable exotoxine of *Bacillus thuringiensis*. In : Burges H. D. et N. W. Hussey (éds), *Microbial Control of insects and mites*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, pp. 275-303.
- Bravo, A., R. Quintero, C. Diaz, A. Martinez et M. Soberon. 1993. Efficiency of insecticidal crystal protein production in a *Bacillus thuringiensis* mutant with derepressed expression of the terminal oxidase aa<sub>3</sub> during sporulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39 : 558-562.
- Brock, D. T. et M. T. Madigan. 1991. *Biology of Microorganisms*, 6<sup>th</sup> edition. Prentice Hall, New Jersey, États-Unis, 874 p.
- Bulla, L. A., K. J. Kramer et L. I. Davidson. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bact.*, 130 : 375-383.
- Bulla, L. A., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Schethna, A. I. Aronson et P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 8 : 147-204.
- Cooksey, K. E. 1971. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : biochemistry and mode of action. In : Burges, H. D. et N. W. Hussey (éds), *Microbial Control of insects and mites*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, pp. 247-274.

- Cooper, D. 1994. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. *Agricul. Ecosyst. Env.*, 49 : 21-26.
- Dulmage, H. T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolates of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invert. Pathol.*, 15 : 232-239.
- Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In : Burges, H. D. (éd.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, Academic Press Inc., Londres, Royaume-Uni, pp. 193-221.
- Edward, C. 1990. Thermophiles. In : Edward, C. (éd.), *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill Publishing Company, Montréal, Canada, pp. 1-31.
- Egorov, N. S., Zh. K. Loriya et T. G. Yudina. 1984. Influence of amino-acids on the synthesis of exoprotease by *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 19 : 487-491.
- Ellar, D. J. 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins and prospects for biopesticide improvement. In : Evans, H. F. (éd.), *1997 BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or necessity ?*, British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, pp. 83-100.
- Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey et S. Higgs (éds). 1993. *The Bacillus Thuringiensis, An Environnement Biopesticide, Theory & Practice*. Johns Wiley & Sons Ltd, New York, États-Unis, ... p.
- Fast, P. G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In : Burges, H. D. (éd.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, Academic Press Inc., Londres, Royaume-Uni, pp. 221-248.
- Faust, R. M. et L. A. Bulla 1982. Bacteria and their toxins as insecticides. In : Kurstak, E. (éd.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, États-Unis, pp.75-207.

- Faust, R. M., A. Kazunori, A. H. Gary, T. Itzuka, L. A. Bulla et C. L. Meyers. 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, 9 : 98-103.
- Foster, J. W. et F. Heiligman. 1949. Biochemical factors influencing sporulation in a strain of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 57 : 639-646.
- Foster, S. J. et K. Johnstone. 1989. The trigger mechanism of bacterial spore germination. In : Smith, I., R. A. Slepecky et P. Setlow (éds), *Regulation of procaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, États-Unis, pp. 89-107.
- Frankenhuyzen, K. 1990. Development and current status of *Bacillus thuringiensis* for control of defoliating forest insects. *The forest chronicle*, octobre 1990 : 498-507.
- Freitelson, J. S., J. Payne et L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis* : insects and beyond. *Bio/Technology*, 10 : 271-275.
- Gadd, G. M. 1990. Metal tolerance. In : Edward, C. (éd.), *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill Publishing Company, Montréal, Canada, pp. 179-210.
- Georgis, R. 1997. Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture. Dans : Evans, H. F. (éd.), *1997 BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or Necessity ?*, British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, pp.243-252.
- Gonzalez, J. M. et B. C. Carlton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid*, 11 : 28-38.
- Gould, G. W. 1969. *The bacterial spore*. Academic Press, New York, États-Unis, 724 p.
- Halvorson, H. G. 1957. Rapid and simultaneous sporulation. *J. appl. Bact.*, 20 (3) : 305-314.

- Hardwick, W. A. et J. W. Foster. 1969. On the nature of sporogenesis in some aerobic bacteria. *J. gen. Physiol.*, 35 : 907-927.
- Harris, J. G. 1997. Microbial insecticides - an industry perspective. In : Evans, H. F. (éd.), 1997 *BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or Necessity ?*, British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, pp. 41-50.
- Höfte, H. et H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. rev.*, 53 (2) : 242-255.
- Huber, H. E. et P. Lüthy. 1987. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : composition and activation. In : Davidson, E. W. (éd.), *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*, Allenheld, Osmun, p. 209-234.
- Ingledeu, W. J. 1990. Acidophiles. In : Edward, C. (éd.), *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill Publishing Company, Montréal, Canada, pp. 34-53.
- Kroll, R. G. 1990. Alkalophiles. In : Edward, C. (éd.), *Microbiology of extreme environments*, McGraw-Hill Publishing Company, Montréal, Canada, pp. 56-91.
- Lecadet, M.-M. et R. Dedonder. 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of *Bacillus thuringiensis* during sporulation. *Eur. J. Biochem.*, 23 : 282-294.
- Lecadet, M.-M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, S. Hamon, P. Laurent et I. Thiéry. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 86 : 660-672.
- Lechowich, R. V. et Z. J. Ordal. 1962. The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores. *Can. J. Microbiol.*, 8 (3) : 287-295.

- Lereclus, D., C. Bourgouin, M.-M. Lecadet, A. Klier et G. Rapoport. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In : Smith, I., R. A. Slepecky et P. Setlow (éds), *Regulation of procaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, Etats-Unis, pp. 255-276.
- Levine, B. A. 1985. Biological role of calcium. In : Dring, G. F. , D. F. Ellar et G. W. Gould (éds), *Fundamental and applied aspects of bacterial spores*, Academic Press Inc., New York., États-Unis, pp. 47-58.
- Lewin, B. 1993. *Genes V*. Oxford University Press, New York, Etats-Unis, 1257 p.
- Lisansky, S. 1997. Microbial biopesticides. In : Evans, H. F. (éd.), *1997 BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or Necessity ?*, British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, pp. 3-10.
- Lundgren, D. G. et J. J. Cooney. 1962. Chemical analyses of asporogenic mutants of *Bacillus cereus*. *J. Bact.*, 83 : 1287-1293.
- Lüthy, P., J.-L. Cordier et H.-M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide : basic considerations and application. In : Kurstak, E. (éd.), *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, États-Unis, pp. 35-74.
- Lüthy, P., H.-R. Ebersold, J. L. Cordier et H. M. Fischer. 1985. Insecticidal metabolites of spore-forming bacilli. In : Dring, G. F., D. F. Ellar et G. W. Gould (éds), *Fundamental and applied aspects of bacterial spores*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, pp. 475-484.
- Lysenko, O. et M. Kucera. 1971. Micro-organisms as sources of new insecticidal chemicals : toxins. In : Burges, H. D. (éd.), *Microbial Control of insects and mites*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, chapitre 9.

- MEF (Ministère de l'Environnement et de la Faune). 1995. *Pour une gestion durable et responsable de nos matières résiduelles : document de consultation publique*. Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement (BAPE), Québec. 52 p.
- MEF. 1997. *Rapport annuel 1996-1997*. Ministère de l'Environnement et de la Faune et Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement (BAPE), Québec.
- MEF. 1998a. *Rapport annuel 1997-1998*. Ministère de l'Environnement et de la Faune et Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement, Québec.
- MEF. 1998b. *Plan d'action québécois sur la gestion des matières résiduelles 1998-2008*. Ministère de l'Environnement et de la Faune et Bureau d'Audience Publique sur l'Environnement, Québec. 56 p.
- MENVIQ (Ministère de l'Environnement du Québec). 1986. *Sédiments-Détermination de l'azote et du carbone total, Analyse élémentaire (CHN) 86.09/305*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.
- MENVIQ. 1989. *Méthode de digestion des boues d'épuration 89.12/213 – mét. 1.3*. Ministère de l'Environnement du Québec, Québec.
- Montiel, M. L. T. 1997. Utilisation des boues des usines de traitement comme moyen alternatif pour la production de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat. INRS-eau, Université du Québec. Québec.
- Morris, O. N. 1982. Bacteria as pesticides : forest applications. In : Kurstak, E. (éd.) *Microbial and Viral Pesticides*, Marcel Dekker, New York, États-Unis, pp. 239-287.
- Morris, O. N., V. Converse, P. Kanagaratnam et J. S. Davies. 1996. Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 1330). *J. Inv. Pathol.*, 67 : 129-136.

- Murrell, W. G. 1961. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. In : *Microbial reaction to environment, 11<sup>th</sup> symposium of the society for society for general microbiology held at the Royal Institution, London 1961*, Cambridge University Press, Londres, pp. 100-150.
- Neilsen, J. et J. Villadsen. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press, New York, États-Unis.
- Nishitsutsuji-Uwo, J., A. Ohsawa et M. S. Nishimura. 1977. Factors affecting the insecticidal activity of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Inv. Pathol.*, 29 : 162-169.
- Norris, J. R. 1971. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis* : biosynthesis and physical structure. In : Burges, H. D et N. W. Hussey (éds), *Microbial Control of insects and mites*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, pp. 229-246.
- Ordal, Z. J. 1957. Effects of nutritional and environmental conditions of sporulation. *Publ. Amer. Inst. Biol. Sci.*, 5 : 18-30.
- Pearson, D. et O. D. Ward. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.*, 10 (7) : 451-456.
- Pelmont, J. 1993a. *Bactéries et Environnement : Adaptations Physiologiques*. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble., France, 899 p.
- Pelmont, J. 1993b. *Enzymes*. Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, France, 605 p.
- Pelzcar, M. J., E. C. S. Chan et N. R. Krieg. 1993. *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill Inc., New York, États-Unis, 896 p.

- Piggot, J. P., J. E. Bylund et M. L. Higgins. 1994. Morphogenesis and gene expression during sporulation. In : Piggot, J. P. et M. Youngman (éds), *Regulation of bacterial differentiation*, American Society for Microbiology, Washington, États-Unis, pp. 113-137.
- Piggot, P. J. et J. G. Coote. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol. Rev.*, 40 (4) : 908-962.
- Powell, J. F. 1953. Isolation of dipicolinic acid (pyridine-2 : 6-dicarboxylic acid) from spores of *Bacillus megatherium*. *Biochem. J.*, 54 : 210-211.
- Powell, J. F. et J. R. Hunter. 1955. The sporulation of *Bacillus sphaericus* stimulated by association with other bacteria : an effect of carbon dioxide. *J. gen. Microbiol.*, 13 : 54-58.
- Rajalakshi, S. et Y. L. Sethna. 1977. The effects of amino acids on growth, sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Ind. Inst. Sci.*, 59 : 169-176.
- Roth, N. G., D. H. Lively et H. M. Hodge. 1955. Chemical analyses of asporogenic mutants of *Bacillus cereus*. *J. Bact.*, 69 : 455-459.
- Rowe, G. E. et A. Margaritis. 1987. Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 6 (1) : 87-127.
- Royce, P. N. 1992. Effect of changes in pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 40 : 1129-1138.
- Salama, H. S., M. S. Foda, H. T. Dulmage et A. El-Sharaby. 1983. Novel fermentation media for production of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Inv. Pathol.*, 41 : 8-19.
- Sarjeet, S. G., A. E. Cowles et P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37 : 615-636.

- Sebesta, K., J. Farkas, K. Horska et J. Vankova. 1981. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In : Burges, H. D. (éd.), *Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980*, Academic Press Inc., New York, États-Unis, pp. 249-281.
- Sikdar, D. P., M. K. Majumdar et S. K. Majumdar. 1991. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnol. lett.*, 13 (7) : 511-514.
- Slepecky, R. A. et H. E. Hemphill. 1992. The genus *Bacillus*-nonmedical. In : Balows, H. G., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer (éds), *The Prokaryotes*, 2<sup>ième</sup> édition, Springer-Verlag, New York, États-Unis, pp. 1663-1696.
- Smith, I. (1989). Initiation of sporulation. In : Smith, I., R. A. Slepecky et P. Setlow (éds) *Regulation of procaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, États-Unis, pp. 185-210.
- Smits, P. H. 1997. Insect pathogens ; their suitability as biopesticides. In : Evans, H. F. (éd.), *1997 BCPC Symposium proceedings no. 68 : Microbial insecticides : Novelty or Necessity ?* British Crop Protection Council, Coventry, Royaume-Uni, pp. 21-28.
- Sneath, P. H. A. 1984. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In : Bergey, D. H., J. G. Holt et N. R. Krieg (éds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams & Wilkins, New York, États-Unis, chapitre 13.
- Sonenshein, A. L. 1989. Metabolic Regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. In : Smith, I., R. A. Slepecky et P. Setlow (éds), *Regulation of procaryotic development*, American Society for Microbiology, Washington, États-Unis, pp. 109-130.
- Starzak, M. et K. B. Rakesh. 1991. A structured model for vegetative growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29 : 699-718.

- Tyagi, R. D., J. F. Blais, N. Meunier et D. Kluepfel. 1993. Biolixiviation des métaux lourds et stabilisation des boues d'épuration : essai en bioréacteur opéré en mode cuvée. *Can. J. Civ. Eng.*, 20 : 57-64.
- Valéro, J. R. 1990. Microbiologie contre tordeuse : recherches à Forêt Canada - Région du Québec. *L'Aubelle*, 12 : 12-15.
- Vadeboncoeur, C. 1997. *Éléments de physiologie bactérienne*. Département de biochimie, Université Laval, Québec.
- Watkinson, I. 1994. Global view of present and future markets for Bt products. *Agricul. Ecosyst. Env.*, 49 : 3-7.
- Wayman, M. et S. R. Parekh. 1990. *Biotechnology of biomass conversion*. Englewood Cliffs, New Jersey, États-Unis, 278 p.
- Whiteley, H. R. et H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40 : 549-576.



## COMPOSITION DU RÉGIME ALIMENTAIRE

**Tableau 24:** Composition du régime alimentaire pour l'élevage de la tordeuse des bourgeons de l'épinette et quantité des ingrédients pour 1 litre d'aliment

Ingrédient	Quantité
Agar.....g	16,7
Eau distillée.....ml	840
Caséine (sans vitamine).....g	35
4 M hydroxide de potassium.....ml	5
Alphacel.....g	5
Mélange de sel (Wesson).....g	10
Sucrose.....g	35
Germe de blé.....g	45,7
Choline chloride.....g	1
Solution vitaminée <sup>1</sup> .....g	10
Acide ascorbique.....g	4
Formaline (37% formaldéhyde).....g	0,5
Méthylparabène.....g	1,5
Poudre d'auréomycine (chortétracycline hydrochloride, 55 mg/g).....g	5,6

<sup>1</sup> 100 ml contient 100 mg de niacine, 100 mg de pentothénate de calcium, 50 mg de riboflavine, 25 mg d'hydrochloride de thiamine, 25 mg hydrochloride de pyrodoxine, 25 mg d'acide folique, 2 mg de biotine et 0.2 mg de vitamine B-12.

## SÉRIES D'EXPÉRIENCES NO. 1-6

**Tableau 25 :** Valeurs des dénombrements de cellules et de spores viables, du taux de sporulation et de l'entomototoxicité lors de plusieurs fermentations de boues mixtes (CUQ, 07/05/99) ou secondaires (CUQ, 25/06/99) par Btk ou Bt-11 en erlenmeyer. Chocs de pH : expériences préliminaires en erlenmeyers.

	Choc	Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomototoxicité UI / $\mu$ l
			totaux	spores		
Série d'expériences no.1 Btk, boues mixtes	Contrôle pH 7	0	5,10E+06	3,20E+01	0,0	
		15	1,90E+07	1,00E+05	0,5	
		16	2,20E+07	1,30E+05	0,6	
		24	3,70E+07	2,40E+07	64,9	
		48	1,05E+08	7,50E+07	71,4	10932
	pH 7->6 (15 h)	0	6,50E+06	3,50E+01	0,0	
		15	2,20E+07	1,38E+05	0,6	
		16	2,15E+07	4,00E+06	18,6	
		24	4,00E+07	1,95E+07	48,8	
		48	1,45E+08	1,30E+08	89,7	10010
	pH 7->5.5 (15 h)	0	4,90E+06	2,40E+01	0,0	
		15	1,80E+07	1,08E+05	0,6	
		16	1,90E+07	2,20E+06	11,6	
		24	2,50E+07	1,36E+07	54,4	
		48	1,15E+08	7,50E+07	65,2	10746
	pH 7->5 (15 h)	0	4,91E+06	3,00E+01	0,0	
		15	1,69E+07	1,46E+05	0,9	
		16	2,08E+07	5,00E+05	2,4	
		24	3,40E+07	3,00E+06	8,8	
		48	6,00E+07	4,00E+07	66,7	2519
Série d'expériences no.2 Btk, boues mixtes	Contrôle pH 7	0	5,30E+06	1,00E+00	0,0	
		6	6,00E+06	1,00E+00	0,0	
		15	9,00E+07	1,15E+05	0,1	
		24	8,60E+07	4,60E+07	53,5	
		48	6,90E+07	6,00E+07	87,0	8519
	pH 7->6->>7 (15-18 h)	0	5,00E+06	1,00E+01	0,0	
		6	5,30E+06	1,00E+01	0,0	
		15	7,80E+07	6,60E+05	0,8	
		18	9,25E+07	6,60E+07	71,4	
		24	1,10E+08	7,90E+07	71,8	
	pH 7->6 (24 h)	0	6,10E+07	6,00E+07	98,4	10261
		6	6,20E+06	1,00E+01	0,0	
		6	5,90E+06	1,00E+01	0,0	
		15	6,30E+07	3,00E+05	0,5	
		24	9,60E+07	7,65E+07	79,7	
	pH 6	25	9,80E+07	9,00E+07	91,8	
		48	7,20E+07	5,50E+07	76,4	12121
		0	3,70E+06	1,00E+01	0,0	
		6	2,90E+06	1,00E+01	0,0	
		15	1,10E+06	1,20E+04	1,1	
24	9,70E+05	5,00E+05	51,5			
48	3,00E+05	1,00E+05	33,3	7376		

Tableau 25: (suite)

Choc	Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomototoxicité UI / µl	
		totaux	spores			
Série d'expériences no.3 Btk, boues mixtes	Contrôle pH 7	0	2.90E+06	1.00E+01	0.0	
		6	2.95E+06	1.00E+01	0.0	
		15	7.40E+07	1.00E+06	1.4	
		18	9.60E+07	5.20E+07	54.2	
		24	1.40E+08	7.50E+07	53.6	
		48	1.10E+08	7.75E+07	70.5	8419
	pH 7 ->6 (15-48 h)	0	2.60E+06	1.00E+00	0.0	
		6	2.60E+06	1.00E+00	0.0	
		15	8.30E+07	1.35E+05	0.2	
		18	1.28E+08	8.15E+07	63.7	
		24	1.40E+08	1.00E+08	71.4	
		48	1.20E+08	1.00E+08	83.3	10850
	pH 7 ->8 ->6 (15-18 h)	0	2.70E+06	1.00E+01	0.0	
		6	2.70E+06	1.00E+01	0.0	
		15	8.10E+07	1.50E+05	0.2	
		18	9.20E+07	4.20E+07	45.7	
		24	1.47E+08	1.00E+08	68.0	
		48	1.11E+08	9.00E+07	81.1	12310
	pH 7 ->8 ->7 (15-18 h)	0	2.90E+06	1.00E+01	0.0	
		6	3.00E+06	1.00E+01	0.0	
		15	6.90E+07	1.20E+05	0.2	
		18	7.70E+07	3.30E+07	42.9	
		24	8.10E+07	4.50E+07	55.6	
		48	6.90E+07	4.70E+07	68.1	9669
Série d'expériences no.4 Bt-11, boues mixtes	Contrôle pH 7	0	6.20E+06	1.87E+02	0.0	
		6	8.20E+06	1.00E+03	0.0	
		15	6.20E+07	3.10E+06	5.0	
		16	7.12E+07	4.50E+06	6.3	
		24	2.50E+08	1.10E+08	44.0	
		25	2.40E+08	1.10E+08	45.8	
	48	2.30E+08	1.70E+08	73.9	9079	
	pH 7 ->6 (15-48 h)	0	4.60E+06	6.10E+02	0.0	
		6	6.50E+06	4.30E+04	0.7	
		15	2.70E+08	6.25E+06	2.3	
		16	4.10E+08	9.15E+07	22.3	
		24	4.10E+08	3.70E+08	90.2	
		25	4.05E+08	3.55E+08	87.7	
	48	2.50E+08	2.10E+08	84.0	11507	
	pH 7 ->6 (24-48 h)	0	5.90E+06	2.20E+02	0.0	
		6	6.00E+06	3.20E+03	0.1	
		15	6.10E+07	4.10E+05	0.7	
		16	6.60E+07	3.20E+06	4.8	
		24	3.20E+08	1.40E+08	43.8	
		25	3.70E+08	3.10E+08	83.8	
	48	3.10E+08	2.90E+08	93.5	10674	
	pH 7 ->5,5 (24-48 h)	0	4.00E+06	5.10E+02	0.0	
		6	5.15E+06	1.00E+04	0.2	
		15	1.00E+08	5.30E+06	5.3	
16		1.80E+08	5.90E+06	3.3		
24		4.50E+08	3.00E+08	66.7		
25		4.50E+08	3.40E+08	75.6		
48	2.10E+08	1.70E+08	81.0	10350		

Tableau 25: (suite)

	Choc	Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
			totaux	spores		
Série d'expériences no.5 Btk, boues secondaires	Contrôle pH 7	0	3.40E+06	1.00E+00	0,0	
		15	1.04E+08	1.00E+04	0,0	
		16	1.70E+08	1.00E+04	0,0	
		24	4.16E+08	1.12E+08	26,9	
		25	4.20E+08	1.30E+08	31,0	
		48	4.00E+08	2.85E+08	71,3	11340
	pH 7 >-6 (15-48 h)	0	3.35E+06	1.00E+00	0,0	
		15	9.20E+07	1.00E+04	0,0	
		16	9.10E+07	9.00E+06	9,9	
		24	5.10E+08	3.00E+08	58,8	
		25	5.25E+08	3.30E+08	62,9	
		48	5.60E+08	3.60E+08	64,3	12714
	pH 7 >-6 (24-48 h)	0	3.40E+06	1.00E+00	0,0	
		15	9.50E+07	1.00E+04	0,0	
		16	1.05E+08	1.00E+04	0,0	
		24	2.25E+08	1.10E+08	48,9	
		25	2.30E+08	1.65E+08	71,7	
		48	3.70E+08	2.75E+08	74,3	11973
Série d'expériences no.6 Bt-11, boues secondaires	Contrôle pH 7	0	7.80E+06	2.70E+03	0,0	
		15	7.55E+07	1.00E+04	0,0	
		16	1.13E+08	1.00E+04	0,0	
		24	5.65E+08	2.60E+08	46,0	
		25	5.50E+08	2.66E+08	48,4	
		48	2.50E+08	2.00E+08	80,0	8648
	pH 7 >-6 (15-48 h)	0	7.20E+05	3.00E+03	0,4	
		15	6.50E+07	1.00E+04	0,0	
		16	1.07E+08	1.00E+04	0,0	
		24	2.10E+08	1.10E+08	52,4	
		25	2.35E+08	1.25E+08	53,2	
		48	2.00E+08	1.50E+08	75,0	6410
	pH 7 >-6 (24-48 h)	0	6.00E+06	2.40E+03	0,0	
		15	8.00E+07	1.00E+04	0,0	
		16	1.40E+08	1.00E+04	0,0	
		24	5.30E+08	3.40E+08	64,2	
		25	5.50E+08	4.05E+08	73,6	
		48	4.40E+08	3.80E+08	86,4	7436

## SERIE D'EXPERIENCE NO.7

**Tableau 26:** Valeur des dénombrements de cellules et de spores viables, du taux de sporulation et de l'entomotoxicité lors de plusieurs fermentations de boues secondaires (CUQ, 25/06/99) par Btk en erlenmeyer. Chocs thermiques : expériences préliminaires en erlenmeyers.

Choc	Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / $\mu$ l	
		totaux	spores			
Série d'expériences no.7 Btk, boues secondaires	Contrôle 30°C	0	1,00E+05	2,00E+02	0,2	
		6	5,00E+06	4,50E+04	0,9	
		15	1,78E+08	1,25E+05	0,1	
		16	1,42E+08	3,00E+05	0,2	
		24	3,15E+08	8,50E+07	27,0	7878
		25	2,95E+08	8,00E+07	27,1	
		30	3,00E+08	1,10E+08	36,7	7796
		48	2,38E+08	1,80E+08	75,6	10716
	30-40-30°C (15-16 h)	0	1,00E+05	2,00E+02	0,2	
		6	2,55E+05	9,00E+03	3,5	
		15	1,24E+08	2,70E+05	0,2	
		16	1,90E+08	6,70E+05	0,4	7725
		24	2,80E+08	8,50E+07	30,4	
		30	3,50E+08	1,25E+08	35,7	9371
		48	4,90E+08	2,13E+08	43,5	9307
	30-40-30°C (24-25 h)	0	1,00E+05	2,00E+02	0,2	
		6	3,60E+06	3,00E+04	0,8	
		15	1,10E+08	3,20E+05	0,3	
		24	1,50E+08	6,50E+07	43,3	5788
		25	2,10E+08	8,05E+07	38,3	
		30	2,50E+08	8,80E+07	35,2	7526
		48	3,35E+08	1,91E+08	57,0	9613

### CONTRÔLE BOUES MIXTES

**Tableau 27:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues mixtes (CUQ, 07-05-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues mixtes.

Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	1,24E+06	1,00E+00	0,0	
3	1,27E+06	1,00E+00	0,0	
6	4,55E+06	1,00E+00	0,0	
7	6,25E+06	1,00E+00	0,0	
8	7,90E+06	1,00E+00	0,0	
9	9,60E+06	1,00E+00	0,0	
10	1,43E+07	1,00E+00	0,0	
11	1,67E+07	1,00E+00	0,0	
12	2,94E+07	1,00E+00	0,0	
15	4,60E+07	3,23E+07	70,2	
16,5	4,80E+07	4,40E+07	91,7	
18	6,20E+07	4,03E+07	65,0	
21	7,10E+07	4,95E+07	69,7	
30	1,17E+08	7,27E+07	62,1	
39	1,09E+08	7,43E+07	68,2	
48	1,29E+08	1,14E+08	88,4	
6	3,60E+06	3,00E+04	0,8	
15	1,10E+08	3,20E+05	0,3	
24	1,50E+08	6,50E+07	43,3	
25	2,10E+08	8,05E+07	38,3	
30	2,50E+08	8,80E+07	35,2	
48	3,35E+08	1,91E+08	57,0	10671

**Tableau 28:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues mixtes (CUQ, 07-05-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues mixtes.

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	31,6	39,9	6,95
0,1	31,6	39,9	6,95
0,2	31,6	39,9	6,95
0,3	31,6	39,9	6,95
0,4	31,6	39,9	6,95
0,5	31,6	39,9	6,95
0,6	31,6	39,9	6,95
0,7	31,6	39,9	6,95
0,8	31,6	39,9	6,95
0,9	31,6	39,9	6,95
1,0	31,6	39,9	6,95
1,1	31,6	39,9	6,95
1,2	31,6	39,9	6,95
1,2	31,6	39,9	6,95
1,3	31,6	39,9	6,95
1,4	31,6	39,9	6,95
1,5	31,6	39,9	6,95
1,6	31,6	34,9	6,95
1,7	31,6	34,9	6,95
1,8	31,6	34,9	6,95
1,9	31,6	34,9	6,95
2,0	31,6	34,9	6,95
2,1	31,6	34,9	6,95
2,2	31,6	29,8	6,95
2,3	31,6	29,8	6,95
2,4	31,6	24,6	6,95
2,5	31,6	24,6	6,95
2,6	31,6	24,6	6,95
2,7	31,6	19,4	6,95
2,8	31,6	14,2	6,95
2,9	31,6	14,2	6,95
3,0	31,6	14,2	6,95
3,1	31,6	14,2	6,95
3,2	31,6	9,1	6,95
3,3	31,6	3,6	6,95
3,4	31,6	3,6	6,95
3,5	31,6	3,6	6,95
3,6	31,6	3,6	6,95
3,6	31,6	3,6	6,95
3,7	31,6	3,6	6,95
3,8	31,6	3,6	6,95
3,9	31,6	3,6	6,95
4,0	31,6	3,6	6,95
4,1	31,6	3,6	6,95
4,2	31,6	3,6	6,95
4,3	31,6	3,6	6,95
4,4	31,6	3,6	6,95
4,5	31,6	3,6	6,95
4,6	31,6	3,6	6,95
4,7	31,6	3,6	6,95
4,8	31,6	3,6	6,95
4,9	31,6	3,6	6,95
5,0	31,6	3,6	6,95
5,1	31,6	3,6	6,95
5,2	31,6	3,6	6,95
5,3	31,6	3,6	6,95
5,4	31,6	3,6	6,95
5,5	31,6	3,6	6,95
5,6	31,6	3,6	6,95
5,7	31,6	3,6	6,95
5,8	31,6	3,6	6,95
5,9	31,6	3,6	6,95
6,0	31,6	3,6	6,95
6,0	31,6	3,6	6,95
6,1	31,6	3,6	6,95
6,2	31,6	3,6	6,95
6,3	31,6	3,6	6,95
6,4	31,6	3,6	6,95
6,5	31,6	3,6	6,95
6,6	31,6	3,6	6,95

6.7	31,6	3,6	6,95
6.8	31,6	3,6	6,95
6.9	31,6	3,6	6,95
7.0	31,6	3,6	6,95
7.1	31,6	3,6	6,95
7.2	31,6	3,6	6,95
7.3	31,6	3,6	6,95
7.4	31,6	3,6	6,95
7.5	31,6	3,6	6,95
7.6	31,6	3,6	6,95
7.7	31,6	8,9	6,95
7.8	31,6	8,9	6,95
7.9	31,6	3,1	6,95
8.0	31,6	3,1	6,95
8.1	31,6	3,1	6,95
8.2	31,6	8,5	6,95
8.3	31,6	8,5	6,95
8.4	31,6	3,4	6,95
8.4	31,6	3,4	6,95
8.5	31,6	8,7	6,95
8.6	31,6	8,7	6,95
8.7	31,6	13,8	6,95
8.8	31,6	13,8	6,95
8.9	31,6	8,1	6,95
9.0	31,6	8,1	6,95
9.1	31,6	13,1	6,95
9.2	31,6	13,1	6,95
9.3	31,6	13,1	6,95
9.4	31,6	8,0	6,95
9.5	31,6	8,0	6,95
9.6	31,6	8,0	6,95
9.7	31,6	13,2	6,95
9.8	31,6	13,2	6,95
9.9	31,6	7,8	6,95
10.0	31,6	7,8	6,95
10.1	31,6	7,8	6,95
10.2	31,6	13,0	6,95
10.3	31,6	13,0	6,95
10.4	31,6	7,6	6,95
10.5	31,6	7,6	6,95
10.6	31,6	13,0	6,95
10.7	31,6	13,0	6,95
10.8	31,6	13,0	6,95
10.8	31,6	7,6	6,95
10.9	31,6	7,6	6,95
11.0	31,6	13,0	6,95
11.1	31,6	13,0	6,95
11.2	31,6	13,0	6,95
11.3	31,6	7,8	6,95
11.4	31,6	7,8	6,95
11.5	31,6	13,0	6,95
11.6	31,6	13,0	6,95
11.7	31,6	13,0	6,95
11.8	31,6	7,9	6,95
11.9	31,6	7,9	6,95
12.0	31,6	13,0	6,95
12.1	31,6	13,0	6,95
12.2	31,6	13,0	6,95
12.3	31,6	7,8	6,95

12.4	31,6	7,8	6,95
12.5	31,6	13,2	6,95
12.6	31,6	13,2	6,95
12.7	31,6	13,2	6,95
12.8	31,6	7,6	6,95
12.9	31,6	7,6	6,95
13.0	31,6	12,7	6,95
13.1	31,6	12,7	6,95
13.2	31,6	12,7	6,95
13.2	31,6	7,5	6,95
13.3	31,6	7,5	6,95
13.4	31,6	7,5	6,95
13.5	31,6	12,5	6,95
13.6	31,6	12,5	6,95
13.7	31,6	7,1	6,95
13.8	31,6	7,1	6,95
13.9	31,6	12,6	6,95
14.0	31,6	12,6	6,95
14.1	31,6	12,6	6,95
14.2	31,6	7,5	6,95
14.3	31,6	7,5	6,95
14.4	31,6	12,7	6,95
14.5	31,6	12,7	6,95
14.6	31,6	12,7	6,95
14.7	31,6	7,6	6,95
14.8	31,6	7,6	6,95
14.9	31,6	7,6	6,95
15.0	31,6	12,9	6,95
15.1	31,6	12,9	6,95
15.2	31,6	7,5	6,95
15.3	31,6	7,5	6,95
15.4	31,6	12,6	6,95
15.5	31,6	12,6	6,95
15.6	31,6	12,6	6,95
15.6	31,6	7,6	6,95
15.7	31,6	7,6	6,95
15.8	31,6	12,8	6,95
15.9	31,6	12,8	6,95
16.0	31,6	17,9	6,95
16.1	31,6	12,6	6,95
16.2	31,6	12,6	6,95
16.3	31,6	12,6	6,95
16.4	31,6	17,6	6,95
16.5	31,6	17,6	6,95
16.6	31,6	17,6	6,95
16.7	31,6	12,0	6,95
16.8	31,6	12,0	6,95
16.9	31,6	17,1	6,95
17.0	31,6	17,1	6,95
17.1	31,6	17,1	6,95
17.2	31,6	11,9	6,95
17.3	31,6	11,9	6,95
17.4	31,6	16,9	6,95
17.5	31,6	16,9	6,95
17.6	31,6	16,9	6,95
17.7	31,6	16,9	6,95
17.8	31,6	16,9	6,95
17.9	31,6	16,9	6,95
18.0	31,6	16,9	6,95

18.0	31,6	22,1	6,95
18.1	31,6	17,0	6,95
18.2	31,6	17,0	6,95
18.3	31,6	17,0	6,95
18.4	31,6	17,0	6,95
18.5	31,6	17,0	6,95
18.6	31,6	17,0	6,95
18.7	31,6	17,0	6,95
18.8	31,6	17,0	6,95
18.9	31,6	22,2	6,95
19.0	31,6	22,2	6,95
19.1	31,6	17,0	6,95
19.2	31,6	17,0	6,95
19.3	31,6	17,0	6,95
19.4	31,6	22,3	6,95
19.5	31,6	22,3	6,95
19.6	31,6	22,3	6,95
19.7	31,6	22,3	6,95
19.8	31,6	22,3	6,95
19.9	31,6	22,3	6,95
20.0	31,6	22,3	6,95
20.1	31,6	22,3	6,95
20.2	31,6	22,3	6,95
20.3	31,6	22,3	6,95
20.4	31,6	22,3	6,95
20.4	31,6	22,3	6,95
20.5	31,6	22,3	6,95
20.6	31,6	22,3	6,95
20.7	31,6	22,3	6,95
20.8	31,6	22,3	6,95
20.9	31,6	22,3	6,95
21.0	31,6	22,3	6,95
21.1	31,6	22,3	6,95
21.2	31,6	22,3	6,95
21.3	31,6	22,3	6,95
21.4	31,6	22,3	6,95
21.5	31,6	22,3	6,95
21.6	31,6	22,3	6,95
21.7	31,6	22,3	6,95
21.8	31,6	22,3	6,95
21.9	31,6	22,3	6,95
22.0	31,6	22,3	6,95
22.1	31,6	22,3	6,95
22.2	31,6	22,3	6,95
22.3	31,6	22,3	6,95
22.4	31,6	22,3	6,95
22.5	31,6	22,3	6,95
22.6	31,6	22,3	6,95
22.7	31,6	22,3	6,95
22.8	31,6	22,3	6,95
22.8	31,6	22,3	6,95
22.9	31,6	22,3	6,95
23.0	31,6	22,3	6,95
23.1	31,6	22,3	6,95
23.2	31,6	22,3	6,95
23.3	31,6	22,3	6,95
23.4	31,6	22,3	6,95
23.5	31,6	22,3	6,95
23.6	31,6	22,3	6,95

23.7	31,6	22,3	6,95
23.8	31,6	22,3	6,95
23.9	31,6	22,3	6,95
24.0	31,6	22,3	6,95
24.1	31,6	22,3	6,95
24.2	31,6	22,3	6,95
24.3	31,6	22,3	6,95
24.4	31,6	22,3	6,95
24.5	31,6	22,3	6,95
24.6	31,6	22,3	6,95
24.7	31,6	22,3	6,95
24.8	31,6	22,3	6,95
24.9	31,6	22,3	6,95
25.0	31,6	22,3	6,95
25.1	31,6	27,5	6,95
25.2	31,6	27,5	6,95
25.2	31,6	22,4	6,95
25.3	31,6	22,4	6,95
25.4	31,6	22,4	6,95
25.5	31,6	27,5	6,95
25.6	31,6	27,5	6,95
25.7	31,6	22,5	6,95
25.8	31,6	22,5	6,95
25.9	31,6	22,5	6,95
26.0	31,6	27,7	6,95
26.1	31,6	27,7	6,95
26.2	31,6	22,6	6,95
26.3	31,6	22,6	6,95
26.4	31,6	22,6	6,95
26.5	31,6	27,7	6,95
26.6	31,6	27,7	6,95
26.7	31,6	27,7	6,95
26.8	31,6	27,7	6,95
26.9	31,6	27,7	6,95
27.0	31,6	27,7	6,95
27.1	31,6	27,7	6,95
27.2	31,6	27,7	6,95
27.3	31,6	27,7	6,95
27.4	31,6	27,7	6,95
27.5	31,6	27,7	6,95
27.6	31,6	27,7	6,95
27.6	31,6	27,7	6,95
27.7	31,6	27,7	6,95
27.8	31,6	27,7	6,95
27.9	31,6	27,7	6,95
28.0	31,6	27,7	6,95
28.1	31,6	27,7	6,95
28.2	31,6	27,7	6,95
28.3	31,6	27,7	6,95
28.4	31,6	27,7	6,95
28.5	31,6	27,7	6,95
28.6	31,6	27,7	6,95
28.7	31,6	27,7	6,95
28.8	31,6	27,7	6,95
28.9	31,6	27,7	6,95
29.0	31,6	27,7	6,95
29.1	31,6	27,7	6,95
29.2	31,6	27,7	6,95
29.3	31,6	27,7	6,95



### CONTRÔLE BOUES SECONDAIRES

**Tableau 29:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues secondaires.

Temps (hres)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	1,37E+06	3,60E+02	0,0	
3	2,40E+06	4,00E+02	0,0	
6	8,70E+06	3,85E+02	0,0	
9	2,60E+07	5,60E+03	0,0	
12	7,80E+07	4,80E+05	0,6	
15	1,00E+08	1,00E+07	10,0	
16	2,45E+08	2,50E+07	10,2	
18	3,20E+08	1,45E+08	45,3	
21	2,90E+08	2,00E+08	69,0	
24	3,00E+08	2,50E+08	83,3	10529
48	3,00E+08	2,20E+08	73,3	10258

**Tableau 30:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. Contrôle boues secondaires.

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH	2,1	31,2	98,7	6,82	4,4	31,4	97,6	6,83	6,7	32,0	23,4	7,10
0,0	30,7	98,9	7,08	2,2	31,5	98,4	6,81	4,5	31,8	97,3	6,82	6,8	31,8	23,9	7,15
0,1	31,4	94,9	7,03	2,3	32,2	98,2	6,80	4,6	31,6	98,0	6,80	6,9	32,0	22,4	7,20
0,2	30,8	99,9	7,00	2,4	31,4	99,4	6,80	4,7	32,3	99,1	6,78	7,0	32,1	23,0	7,22
0,3	31,3	99,9	6,99	2,5	30,6	99,0	6,86	4,8	32,4	95,4	6,94	7,1	31,9	22,2	7,14
0,4	31,2	99,7	6,96	2,6	30,6	97,2	6,82	4,9	31,1	93,7	6,89	7,2	32,1	21,7	7,20
0,5	30,8	99,6	6,95	2,7	30,3	99,1	6,81	5,0	32,3	92,7	6,86	7,3	31,5	21,5	7,17
0,6	31,6	99,9	6,95	2,8	31,5	98,8	6,78	5,1	31,3	93,0	6,85	7,4	31,8	23,0	7,21
0,7	31,0	99,4	6,93	2,9	31,7	99,9	6,93	5,2	32,2	92,8	6,82	7,5	30,8	21,6	7,20
0,8	31,8	99,9	6,92	3,0	31,8	99,9	6,91	5,3	31,7	90,5	6,78	7,6	30,7	21,2	7,12
0,9	31,5	99,9	6,92	3,1	31,7	99,9	6,87	5,4	31,1	87,0	6,86	7,7	31,0	21,6	7,20
1,0	32,1	99,9	6,91	3,2	31,9	99,9	6,86	5,5	31,5	82,2	6,81	7,8	31,8	21,3	7,20
1,1	32,3	99,9	6,89	3,3	31,4	99,9	6,83	5,6	31,5	79,0	6,81	7,9	31,3	22,6	7,21
1,2	30,6	99,9	6,89	3,4	31,6	99,9	6,81	5,7	31,6	75,3	6,78	8,0	31,6	25,8	7,21
1,2	31,7	99,9	6,87	3,5	31,8	99,9	6,78	5,8	31,7	69,7	6,82	8,1	31,2	25,7	7,20
1,3	31,1	99,9	6,88	3,6	31,8	99,9	6,82	5,9	30,8	66,4	6,81	8,2	31,0	23,8	7,18
1,4	31,7	99,9	6,86	3,6	31,9	99,9	6,80	6,0	30,6	57,5	6,81	8,3	31,0	24,6	7,17
1,5	31,9	99,9	6,86	3,7	31,4	99,2	6,91	6,0	31,5	48,7	6,80	8,4	32,2	24,6	7,18
1,6	31,3	97,0	6,86	3,8	31,9	99,9	6,88	6,1	31,8	40,0	6,81	8,4	31,6	25,7	7,19
1,7	31,7	97,9	6,84	3,9	31,7	99,8	6,86	6,2	31,7	33,1	6,83	8,5	31,3	26,4	7,13
1,8	31,3	99,9	6,84	4,0	31,3	99,9	6,83	6,3	32,6	28,8	6,88	8,6	32,1	25,4	7,21
1,9	31,1	98,8	6,83	4,1	31,2	98,9	6,82	6,4	31,6	28,2	6,94	8,7	32,0	26,3	7,18
2,0	32,3	99,0	6,82	4,2	31,4	97,8	6,78	6,5	31,6	25,0	7,00	8,8	31,6	25,3	7,21
				4,3	31,2	97,5	6,78	6,6	31,8	23,5	7,04	8,9	32,6	26,6	7,22

9,0	32,2	26,1	7,07
9,1	32,3	26,8	7,19
9,2	32,2	28,1	7,20
9,3	32,1	34,4	7,09
9,4	31,8	37,5	7,18
9,5	32,8	35,6	7,16
9,6	31,9	38,7	7,18
9,7	31,1	42,3	7,20
9,8	31,3	42,0	7,22
9,9	31,3	39,6	7,15
10,0	31,9	39,6	7,13
10,1	33,4	38,7	7,13
10,2	32,0	38,4	7,20
10,3	32,3	37,8	7,14
10,4	32,7	39,2	7,23
10,5	31,6	38,1	7,13
10,6	33,0	38,7	7,12
10,7	31,6	40,5	7,21
10,8	31,6	42,4	7,20
10,8	32,4	44,9	7,20
10,9	32,4	45,3	7,17
11,0	31,5	48,2	7,17
11,1	32,5	44,6	7,15
11,2	32,2	43,6	7,22
11,3	31,9	42,1	7,20
11,4	31,5	46,2	7,20
11,5	31,4	38,5	7,20
11,6	31,5	38,6	7,15
11,7	31,3	41,5	7,21
11,8	31,4	39,2	7,16
11,9	31,8	38,5	7,20
12,0	32,5	41,9	7,17
12,1	32,0	40,0	7,21
12,2	32,2	41,6	7,20
12,3	32,2	42,0	7,15
12,4	31,9	39,9	7,21
12,5	32,3	43,0	7,17
12,6	32,0	41,2	7,20
12,7	32,5	46,3	7,15
12,8	31,9	48,0	7,20
12,9	31,9	48,8	7,15
13,0	32,2	49,9	7,20
13,1	33,4	51,4	7,20
13,2	33,6	55,5	7,10
13,2	32,1	54,4	7,15
13,3	32,6	54,8	7,19
13,4	32,0	56,3	7,17
13,5	31,3	56,2	7,20

13,6	31,4	55,9	7,16
13,7	31,8	52,6	7,20
13,8	31,1	56,5	7,14
13,9	31,3	55,6	7,18
14,0	31,6	50,9	7,21
14,1	31,3	51,6	7,19
14,2	32,5	52,4	7,21
14,3	31,7	51,2	7,19
14,4	31,6	50,6	7,22
14,5	31,4	51,4	7,19
14,6	31,7	47,6	7,21
14,7	31,2	45,4	7,09
14,8	32,0	47,2	7,15
14,9	32,4	45,9	7,17
15,0	31,8	50,4	7,17
15,1	32,2	47,1	7,20
15,2	31,5	51,3	7,20
15,3	32,6	46,5	7,14
15,4	33,1	49,0	7,17
15,5	32,5	55,2	7,19
15,6	32,3	55,6	7,21
15,6	32,1	61,5	7,19
15,7	31,1	56,4	7,19
15,8	32,0	58,9	7,17
15,9	31,7	59,3	7,17
16,0	32,2	61,4	7,16
16,1	31,7	61,4	7,17
16,2	32,0	63,3	7,15
16,3	33,9	63,0	7,16
16,4	32,1	63,4	7,15
16,5	32,3	70,3	7,15
16,6	31,9	75,8	7,16
16,7	31,1	73,5	7,17
16,8	32,6	72,8	7,17
16,9	32,3	76,9	7,17
17,0	32,1	78,7	7,16
17,1	32,0	81,8	7,17
17,2	31,8	79,6	7,17
17,3	33,0	84,2	7,17
17,4	31,2	86,1	7,17
17,5	32,9	80,5	7,17
17,6	31,5	81,3	7,18
17,7	31,8	91,0	7,19
17,8	30,9	88,8	7,20
17,9	31,2	88,8	7,21
18,0	32,2	85,3	7,20
18,0	32,0	88,6	7,20
18,1	32,4	88,7	7,19

18,2	32,5	86,7	7,20
18,3	32,6	91,3	7,20
18,4	32,0	93,8	7,21
18,5	31,9	91,7	7,21
18,6	31,8	92,6	7,21
18,7	31,9	95,5	7,17
18,8	31,2	90,2	7,19
18,9	33,6	94,9	7,20
19,0	31,5	96,0	7,20
19,1	33,1	98,0	7,17
19,2	31,2	99,7	7,20
19,3	32,0	99,9	7,22
19,4	30,9	99,9	7,13
19,5	31,1	99,9	7,15
19,6	32,4	99,9	7,17
19,7	31,6	99,9	7,20
19,8	31,8	99,9	7,22
19,9	32,0	99,9	7,13
20,0	31,8	99,9	7,15
20,1	32,2	99,9	7,17
20,2	32,3	99,9	7,19
20,3	31,7	99,9	7,20
20,4	31,4	99,9	7,21
20,4	32,4	99,9	7,17
20,5	32,1	99,9	7,20
20,6	30,1	99,9	7,20
20,7	30,7	99,9	7,10
20,8	32,0	99,8	7,14
20,9	31,4	99,9	7,15
21,0	32,3	99,9	7,16
21,1	32,0	99,9	7,17
21,2	31,7	99,9	7,19
21,3	31,6	99,9	7,20
21,4	31,9	99,9	7,21
21,5	31,7	99,9	7,15
21,6	31,5	99,9	7,17
21,7	31,9	99,9	7,21
21,8	31,2	99,9	7,21
21,9	31,1	99,9	7,15
22,0	31,7	99,9	7,18
22,1	31,6	99,9	7,21
22,2	31,1	99,9	7,17
22,3	31,8	99,9	7,19
22,4	31,3	99,9	7,21
22,5	31,6	99,9	7,15
22,6	31,5	99,9	7,17
22,7	31,7	99,9	7,20
22,8	31,9	99,9	7,15

22,8	32,7	99,9	7,19
22,9	31,4	99,9	7,20
23,0	31,2	99,9	7,20
23,1	31,3	99,9	7,21
23,2	30,4	99,9	7,14
23,3	31,0	99,9	7,15
23,4	30,9	99,9	7,19
23,5	32,1	99,9	7,20
23,6	31,7	99,9	7,20
23,7	31,9	99,9	7,21
23,8	31,5	99,9	7,12
23,9	31,8	99,9	7,15
24,0	31,6	99,9	7,17
24,1	32,2	99,9	7,20
24,2	31,2	99,9	7,21
24,3	30,6	99,9	7,10
24,4	31,0	99,9	7,14
24,5	31,3	99,9	7,15
24,6	30,6	99,9	7,17
24,7	30,5	99,9	7,20
24,8	32,0	99,9	7,20
24,9	31,0	99,9	7,10
25,0	30,5	99,9	7,14
25,1	31,6	99,9	7,15
25,2	30,8	99,9	7,16
25,2	32,7	99,9	7,19
25,3	30,5	99,9	7,20
25,4	31,6	99,9	7,21
25,5	32,0	99,9	7,17
25,6	31,8	99,9	7,17
25,7	31,7	99,9	7,20
25,8	31,3	99,9	7,21
25,9	30,0	99,9	7,11
26,0	31,6	99,9	7,13
26,1	32,0	99,9	7,15
26,2	31,2	99,9	7,16
26,3	31,3	99,9	7,17
26,4	31,2	99,9	7,17
26,5	31,7	99,9	7,17
26,6	31,0	99,9	7,18
26,7	31,9	99,9	7,18
26,8	32,2	99,9	7,20
26,9	31,6	99,9	7,20
27,0	31,9	99,9	7,20
27,1	31,3	99,9	7,20
27,2	31,3	99,9	7,22
27,3	31,1	99,9	7,12
27,4	31,9	99,9	7,14

27,5	31,6	99,9	7,14
27,6	31,6	99,9	7,15
27,6	32,1	99,9	7,16
27,7	31,5	99,9	7,17
27,8	30,9	99,9	7,18
27,9	31,1	99,9	7,17
28,0	31,0	99,9	7,19
28,1	31,5	99,9	7,17
28,2	31,2	99,9	7,20
28,3	32,4	99,9	7,20
28,4	31,7	99,9	7,20
28,5	31,8	99,9	7,20
28,6	31,1	99,9	7,21
28,7	31,1	99,9	7,20
28,8	31,9	99,9	7,20
28,9	31,2	99,9	7,20
29,0	31,5	99,9	7,21
29,1	31,8	99,9	7,21
29,2	32,2	99,9	7,17
29,3	31,0	99,9	7,19
29,4	31,4	99,9	7,17
29,5	31,7	99,9	7,18
29,6	31,5	99,9	7,20
29,7	31,2	99,9	7,19
29,8	31,1	99,9	7,19
29,9	31,9	99,9	7,19
30,0	32,3	99,9	7,20
30,0	31,3	99,9	7,20
30,1	31,3	99,9	7,20
30,2	31,1	99,9	7,20
30,3	32,5	99,9	7,22
30,4	31,2	99,9	7,21
30,5	31,2	99,9	7,21
30,6	31,7	99,9	7,20
30,7	31,4	99,9	7,20
30,8	31,1	99,9	7,20
30,9	31,8	99,9	7,21
31,0	31,3	99,9	7,21
31,1	30,8	99,9	7,21
31,2	31,1	99,9	7,20
31,3	31,5	99,9	7,21
31,4	31,6	99,9	7,10
31,5	31,0	99,9	7,11
31,6	31,5	99,9	7,13
31,7	31,2	99,9	7,12
31,8	32,2	99,9	7,13
31,9	32,3	99,9	7,12
32,0	31,1	99,9	7,14

32,1	31,4	99,9	7,15
32,2	31,7	99,9	7,15
32,3	31,5	99,9	7,14
32,4	31,6	99,9	7,15
32,4	31,6	99,9	7,15
32,5	31,9	99,9	7,15
32,6	32,4	99,9	7,15
32,7	31,4	99,9	7,15
32,8	31,2	99,9	7,15
32,9	31,1	99,9	7,16
33,0	31,0	99,9	7,16
33,1	31,5	99,9	7,15
33,2	31,3	99,9	7,15
33,3	31,3	99,9	7,16
33,4	31,0	99,9	7,16
33,5	31,6	99,9	7,16
33,6	31,3	99,9	7,16
33,7	31,8	99,9	7,17
33,8	31,5	99,9	7,16
33,9	31,2	99,9	7,17
34,0	31,6	99,9	7,17
34,1	32,7	99,9	7,17
34,2	31,7	99,9	7,17
34,3	31,5	99,9	7,17
34,4	30,7	99,9	7,17
34,5	31,6	99,9	7,18
34,6	30,5	99,9	7,17
34,7	31,7	99,9	7,17
34,8	31,5	99,9	7,18
34,8	30,7	99,9	7,19
34,9	31,5	99,9	7,19
35,0	31,6	99,9	7,21
35,1	31,3	99,9	7,20
35,2	31,9	99,9	7,20
35,3	31,7	99,9	7,20
35,4	32,0	99,9	7,21
35,5	31,1	99,9	7,20
35,6	31,5	99,9	7,20
35,7	31,6	99,9	7,20
35,8	31,3	99,9	7,20
35,9	31,7	99,9	7,21
36,0	31,1	99,9	7,11
36,1	31,8	99,9	7,11
36,2	31,6	99,9	7,12
36,3	32,6	99,9	7,13
36,4	31,4	99,9	7,14
36,5	32,1	99,9	7,14
36,6	32,7	99,9	7,14

36,7	31,2	99,9	7,15
36,8	31,5	99,9	7,15
36,9	31,1	99,9	7,16
37,0	31,6	99,9	7,17
37,1	31,5	99,9	7,17
37,2	32,4	99,9	7,17
37,2	31,7	99,9	7,19
37,3	31,6	99,9	7,19
37,4	32,7	99,9	7,18
37,5	31,6	99,9	7,20
37,6	30,7	99,9	7,18
37,7	30,3	99,9	7,19
37,8	30,5	99,9	7,19
37,9	31,8	99,9	7,20
38,0	30,3	99,9	7,20
38,1	30,3	99,9	7,20
38,2	31,3	99,9	7,20
38,3	31,0	99,9	7,20
38,4	30,8	99,9	7,20
38,5	32,4	99,9	7,20
38,6	31,8	99,9	7,21
38,7	30,2	99,9	7,21
38,8	31,6	99,9	7,21
38,9	31,8	99,9	7,15
39,0	31,6	99,9	7,15
39,1	31,3	99,9	7,16
39,2	31,2	99,9	7,17
39,3	31,0	99,9	7,17
39,4	31,8	99,9	7,18
39,5	31,2	99,9	7,20
39,6	32,2	99,9	7,20
39,6	32,0	99,9	7,20
39,7	31,3	99,9	7,21
39,8	32,1	99,9	7,11
39,9	31,2	99,9	7,12
40,0	31,6	99,9	7,13
40,1	31,5	99,9	7,12
40,2	31,1	99,9	7,15
40,3	31,2	99,9	7,16
40,4	32,6	99,9	7,15
40,5	32,1	99,9	7,16
40,6	31,6	99,9	7,16
40,7	31,1	99,9	7,16
40,8	30,1	99,9	7,16
40,9	30,3	99,9	7,17
41,0	30,5	99,9	7,17
41,1	30,8	99,9	7,16
41,2	31,8	99,9	7,17

41,3	31,9	99,9	7,17
41,4	32,0	99,9	7,17
41,5	31,3	99,9	7,19
41,6	31,9	99,9	7,20
41,7	30,5	99,9	7,19
41,8	32,1	99,9	7,20
41,9	30,0	99,9	7,20
42,0	32,7	99,9	7,20
42,0	31,8	99,9	7,19
42,1	32,1	99,9	7,21
42,2	30,6	99,9	7,19
42,3	30,7	99,9	7,20
42,4	31,5	99,9	7,20
42,5	32,4	99,9	7,20
42,6	29,9	99,9	7,21
42,7	31,0	99,9	7,20
42,8	30,3	99,9	7,20
42,9	30,8	99,9	7,20
43,0	31,9	99,9	7,20
43,1	31,8	99,9	7,20
43,2	31,6	99,9	7,20
43,3	31,2	99,9	7,20
43,4	32,1	99,9	7,20
43,5	31,1	99,9	7,20
43,6	31,4	99,9	7,19
43,7	32,2	99,9	7,20
43,8	31,2	99,9	7,20
43,9	32,1	99,9	7,21
44,0	31,4	99,9	7,13
44,1	32,1	99,9	7,14
44,2	31,6	99,9	7,14
44,3	31,1	99,9	7,15
44,4	31,5	99,9	7,16
44,4	31,9	99,9	7,17
44,5	31,9	99,9	7,17
44,6	31,5	99,9	7,20
44,7	31,7	99,9	7,20
44,8	31,8	99,9	7,21
44,9	31,5	99,9	7,16
45,0	31,5	99,9	7,18
45,1	31,6	99,9	7,20
45,2	32,0	99,9	7,20
45,3	31,0	99,9	7,22
45,4	31,2	99,9	7,20
45,5	31,0	99,9	7,14
45,6	31,3	99,9	7,16
45,7	31,2	99,9	7,19
45,8	31,1	99,9	7,20

45,9	30,9	99,9	7,11
46,0	31,0	99,9	7,13
46,1	31,7	99,9	7,16
46,2	31,0	99,9	7,17
46,3	31,9	99,9	7,20
46,4	32,1	99,9	7,16
46,5	30,1	99,9	7,20
46,6	31,7	99,9	7,21
46,7	30,9	99,9	7,12
46,8	31,4	99,9	7,17
46,8	32,2	99,9	7,20
46,9	32,0	99,9	7,21
47,0	32,7	99,9	7,13
47,1	31,1	99,9	7,16
47,2	31,1	99,9	7,19
47,3	31,5	99,9	7,20
47,4	31,2	99,9	7,20
47,5	31,7	99,9	7,16
47,6	31,6	99,9	7,19
47,7	32,2	99,9	7,19
47,8	31,8	99,9	7,20

## EXPÉRIENCE A

**Tableau 31:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience A :** contrôle boues secondaires en bioréacteur.

Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	3,00E+06	1,48E+04	0,5	
1,5	6,00E+06	1,68E+04	0,3	
3	1,00E+07	1,00E+05	1,0	
4,5	3,00E+07	2,00E+05	0,7	
6	4,50E+07	5,00E+05	1,1	
7,5	6,10E+07	8,20E+05	1,3	
9	9,05E+07	1,62E+06	1,8	
12	1,00E+08	1,45E+06	1,5	
13,5	9,50E+07	3,15E+06	3,3	
15	1,75E+08	6,55E+06	3,7	
16	2,00E+08	2,15E+07	10,8	
18	3,10E+08	1,35E+08	43,5	
19	3,90E+08	1,80E+08	46,2	
20	3,45E+08	1,80E+08	52,2	
21	3,50E+08	1,75E+08	50,0	
23	3,90E+08	2,00E+08	51,3	
24	4,35E+08	3,25E+08	74,7	10329
25	4,70E+08	2,85E+08	60,6	
27	4,80E+08	3,10E+08	64,6	
28	4,30E+08	3,60E+08	83,7	
30	4,30E+08	3,25E+08	75,6	10792
31	4,40E+08	3,00E+08	68,2	
32	4,20E+08	3,10E+08	73,8	
33	4,00E+08	3,10E+08	77,5	
36	3,70E+08	2,75E+08	74,3	11664
48	3,70E+08	2,70E+08	73,0	10363

**Tableau 32:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience A :** contrôle boues secondaires.

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	30,5	33,5	6,86
0,1	30,8	33,1	6,84
0,2	31,0	32,9	6,83
0,3	30,5	33,6	6,85
0,4	30,6	33,4	6,83
0,5	30,6	32,9	6,82
0,6	30,5	32,9	6,81
0,7	31,0	33,0	6,80

0,8	30,8	32,7	6,80
0,9	30,7	32,8	6,82
1,0	30,7	32,7	6,80
1,1	30,7	32,9	6,87
1,2	30,7	32,8	6,84
1,2	31,3	32,6	6,82
1,3	31,1	32,5	6,80
1,4	30,8	32,4	6,88
1,5	30,7	32,2	6,86

1,6	30,9	32,2	6,83
1,7	31,0	32,0	6,80
1,8	30,8	31,7	6,92
1,9	30,7	31,7	6,88
2,0	30,7	31,5	6,85
2,1	30,6	31,4	6,82
2,2	30,7	31,0	6,82
2,3	30,9	30,0	6,93
2,4	30,7	31,2	6,88

2,5	30,8	31,6	6,86
2,6	31,0	30,2	6,80
2,7	31,2	29,7	6,92
2,8	30,6	29,4	6,87
2,9	30,7	29,3	6,82
3,0	30,8	29,0	6,78
3,1	31,2	28,6	6,80
3,2	30,8	28,1	6,82
3,3	31,2	27,5	6,78

## ANNEXE-6 (suite)

3,4	30,8	27,0	6,82
3,5	31,2	26,0	6,79
3,6	31,0	26,0	6,80
3,6	30,9	25,9	6,81
3,7	31,1	25,7	6,80
3,8	30,9	25,5	6,80
3,9	30,7	25,5	6,79
4,0	30,2	25,3	6,82
4,1	30,8	25,1	6,83
4,2	30,5	24,7	6,84
4,3	30,8	24,7	6,89
4,4	30,1	24,8	6,92
4,5	30,4	24,8	6,94
4,6	30,1	24,7	6,97
4,7	30,7	24,6	7,00
4,8	30,1	24,5	7,03
4,9	30,6	24,3	7,06
5,0	30,2	24,3	7,08
5,1	30,7	24,2	7,11
5,2	30,5	24,1	7,14
5,3	30,1	24,1	7,17
5,4	30,8	24,0	7,17
5,5	30,5	24,0	7,21
5,6	30,4	23,9	7,07
5,7	30,6	23,8	7,14
5,8	30,1	23,8	7,17
5,9	30,4	23,9	7,20
6,0	30,3	24,1	7,21
6,0	30,4	24,3	7,21
6,1	30,2	24,3	7,20
6,2	30,2	26,4	7,21
6,3	30,4	24,1	7,20
6,4	30,4	24,2	7,15
6,5	30,2	24,1	7,20
6,6	30,3	24,1	7,15
6,7	30,5	24,0	7,21
6,8	31,1	24,0	7,20
6,9	30,7	23,9	7,20
7,0	30,5	23,8	7,15
7,1	30,6	23,7	7,21
7,2	30,6	23,8	7,19
7,3	30,7	24,1	7,18
7,4	30,1	24,0	7,20
7,5	30,6	23,9	7,20
7,6	30,7	25,4	7,21
7,7	30,6	24,9	7,19
7,8	30,5	84,1	7,20
7,9	30,7	29,0	7,17

8,0	30,7	48,1	7,15
8,1	30,4	45,4	7,20
8,2	30,6	42,8	7,16
8,3	30,6	29,4	7,21
8,4	30,2	28,4	7,20
8,4	30,7	31,1	7,12
8,5	30,1	27,2	7,16
8,6	30,2	26,8	7,21
8,7	30,5	26,5	7,21
8,8	30,6	26,7	7,19
8,9	30,6	27,1	7,21
9,0	30,5	43,9	7,17
9,1	30,7	49,9	7,21
9,2	30,6	49,9	7,20
9,3	30,4	99,7	7,17
9,4	30,7	99,7	7,22
9,5	30,5	99,7	7,20
9,6	30,2	99,7	7,20
9,7	30,7	99,7	7,14
9,8	30,4	99,7	7,20
9,9	30,4	99,7	7,20
10,0	30,3	99,7	7,21
10,1	30,5	99,7	7,20
10,2	30,5	99,7	7,22
10,3	30,1	97,7	7,21
10,4	30,4	90,0	7,21
10,5	30,6	85,6	7,20
10,6	30,7	82,9	7,20
10,7	30,3	80,8	7,21
10,8	30,2	78,3	7,20
10,8	30,6	76,0	7,20
10,9	30,9	73,9	6,99
11,0	30,2	72,2	7,08
11,1	30,7	70,1	7,12
11,2	30,0	67,4	7,16
11,3	30,0	67,8	7,19
11,4	30,4	66,1	7,20
11,5	30,0	63,8	7,14
11,6	30,0	62,8	7,16
11,7	30,6	61,8	7,20
11,8	30,7	63,2	7,14
11,9	30,6	60,1	7,17
12,0	30,5	59,6	7,20
12,1	30,4	58,3	7,16
12,2	30,5	56,3	7,20
12,3	30,7	56,8	7,04
12,4	30,4	56,5	7,10
12,5	30,5	55,9	7,15

12,6	30,6	53,7	7,18
12,7	30,4	53,2	7,20
12,8	30,6	52,6	7,22
12,9	30,3	54,6	7,15
13,0	30,4	53,0	7,17
13,1	30,5	49,7	7,21
13,2	30,6	49,5	7,17
13,2	30,4	51,3	7,20
13,3	30,5	49,4	7,16
13,4	30,6	49,1	7,20
13,5	30,3	49,4	7,15
13,6	30,8	48,6	7,17
13,7	30,6	49,7	7,20
13,8	30,2	48,4	7,09
13,9	30,5	48,3	7,14
14,0	30,5	46,9	7,17
14,1	30,5	46,2	7,21
14,2	30,8	46,9	7,20
14,3	30,6	45,5	7,15
14,4	30,2	46,4	7,20
14,5	30,7	45,9	7,16
14,6	30,7	44,9	7,21
14,7	31,0	47,0	7,16
14,8	30,7	45,1	7,87
14,9	30,8	44,9	7,81
15,0	30,6	44,9	7,75
15,1	30,6	43,9	7,69
15,2	30,6	43,5	7,70
15,3	30,7	43,1	7,73
15,4	30,1	43,3	7,90
15,5	30,7	42,9	7,85
15,6	30,4	42,9	7,79
15,6	30,7	42,9	7,79
15,7	30,9	46,5	7,83
15,8	30,9	43,2	7,79
15,9	30,7	43,1	7,83
16,0	30,9	42,6	7,82
16,1	30,2	44,0	7,79
16,2	30,7	42,9	7,78
16,3	30,8	42,6	7,84
16,4	30,6	41,9	7,82
16,5	30,6	42,1	7,81
16,6	30,6	41,3	7,80
16,7	30,4	41,2	7,80
16,8	30,4	41,2	7,80
16,9	30,8	41,3	7,80
17,0	30,3	41,6	7,79
17,1	30,5	40,7	7,81

17,2	30,4	40,9	7,81
17,3	30,4	40,3	7,82
17,4	30,6	40,4	7,82
17,5	30,4	40,0	7,82
17,6	30,2	40,2	7,82
17,7	30,4	39,9	7,84
17,8	30,4	39,6	7,83
17,9	30,6	39,9	7,03
18,0	30,5	40,5	7,15
18,0	30,4	39,9	7,20
18,1	30,4	39,8	7,18
18,2	30,6	39,5	7,21
18,3	30,5	39,1	7,20
18,4	30,5	39,0	7,20
18,5	30,7	38,9	7,10
18,6	30,6	38,8	7,20
18,7	30,5	38,9	7,21
18,8	30,6	38,7	7,15
18,9	30,2	39,8	7,20
19,0	30,3	40,9	7,15
19,1	30,2	40,6	7,22
19,2	30,4	40,5	7,16
19,3	30,2	40,5	7,20
19,4	30,4	40,3	7,14
19,5	30,3	40,3	7,21
19,6	30,4	40,2	7,11
19,7	30,5	40,3	7,17
19,8	30,4	39,9	7,20
19,9	30,2	39,9	7,17
20,0	30,8	39,5	7,20
20,1	30,2	39,1	7,15
20,2	30,5	38,7	7,19
20,3	30,2	39,4	7,20
20,4	30,8	38,4	7,17
20,4	30,4	39,8	7,12
20,5	30,8	38,1	7,19
20,6	30,6	38,1	7,06
20,7	30,1	37,9	7,14
20,8	30,5	38,0	7,20
20,9	30,4	37,9	7,13
21,0	30,5	37,6	7,17
21,1	30,5	37,3	7,16
21,2	30,6	36,9	7,21
21,3	30,6	36,5	7,15
21,4	30,5	36,3	7,20
21,5	30,4	36,2	7,19
21,6	30,7	35,8	7,19
21,7	30,7	35,8	7,17

21,8	30,2	35,8	7,10
21,9	30,1	35,6	7,17
22,0	30,2	35,7	7,20
22,1	30,1	35,5	7,19
22,2	30,5	35,3	7,18
22,3	30,1	35,3	7,19
22,4	30,1	35,3	7,21
22,5	30,2	35,3	7,20
22,6	30,0	35,7	7,14
22,7	30,4	36,4	7,20
22,8	30,3	35,7	7,18
22,8	30,2	35,6	7,20
22,9	30,6	35,7	7,22
23,0	30,2	35,6	7,14
23,1	30,1	35,6	7,20
23,2	30,6	35,5	7,17
23,3	30,9	35,5	7,14
23,4	30,1	35,7	7,20
23,5	30,1	35,5	7,16
23,6	30,1	35,8	7,21
23,7	30,6	36,0	7,86
23,8	30,3	35,2	7,79
23,9	30,4	34,9	7,79
24,0	30,6	35,0	7,81
24,1	30,2	35,4	7,82
24,2	30,6	35,8	7,87
24,3	30,2	35,9	7,85
24,4	30,8	35,9	7,83
24,5	30,5	35,8	7,82
24,6	30,6	35,8	7,80
24,7	30,8	35,8	7,79
24,8	30,3	35,9	7,85
24,9	30,2	35,8	7,83
25,0	30,6	35,8	7,83
25,1	30,3	35,7	7,83
25,2	30,6	35,6	7,82
25,2	30,2	35,6	7,83
25,3	30,3	35,6	7,83
25,4	30,5	35,4	7,83
25,5	30,2	35,2	7,84
25,6	30,4	35,0	7,84
25,7	30,5	35,1	7,83
25,8	30,3	35,0	7,84
25,9	30,5	35,0	7,83
26,0	30,6	34,9	7,85
26,1	30,1	34,7	7,85
26,2	30,4	34,6	7,86
26,3	30,2	34,5	7,85

26,4	30,5	34,4	7,86
26,5	30,0	34,7	7,86
26,6	30,3	34,2	7,86
26,7	30,0	34,1	7,86
26,8	30,6	35,2	6,22
26,9	30,4	35,4	6,11
27,0	30,1	35,1	6,21
27,1	30,5	35,0	6,13
27,2	30,2	35,0	6,20
27,3	30,4	34,8	6,16
27,4	29,9	34,8	6,21
27,5	30,0	34,5	6,12
27,6	30,6	34,2	6,17
27,6	30,0	34,0	6,20
27,7	30,1	33,9	6,12
27,8	30,2	33,8	6,17
27,9	30,1	33,7	6,18
28,0	30,6	33,7	6,21
28,1	30,1	33,4	6,12
28,2	30,5	33,4	6,15
28,3	30,2	33,2	6,17
28,4	30,9	33,2	6,20
28,5	30,0	33,2	6,14
28,6	30,2	32,9	6,17
28,7	30,8	32,8	6,20
28,8	30,2	32,7	6,21
28,9	30,3	32,6	6,21
29,0	30,9	32,5	6,13
29,1	30,1	32,5	6,15
29,2	30,3	32,4	6,17
29,3	30,3	32,4	6,18
29,4	30,2	32,2	6,20
29,5	30,3	32,2	6,18
29,6	30,6	32,4	6,20
29,7	30,5	32,6	6,16
29,8	30,6	32,4	6,18
29,9	30,0	32,4	6,20
30,0	30,1	32,2	6,21
30,0	30,6	32,1	6,11
30,1	29,9	32,2	6,12
30,2	30,8	32,0	6,14
30,3	30,2	32,0	6,16
30,4	30,8	31,9	6,17
30,5	30,4	31,8	6,18
30,6	30,0	31,8	6,20
30,7	30,6	31,7	6,22
30,8	30,5	31,8	6,17
30,9	30,5	31,8	6,17

31,0	30,1	31,7	6,20
31,1	30,4	31,6	6,21
31,2	30,5	31,6	6,11
31,3	29,9	31,5	6,12
31,4	30,6	31,4	6,14
31,5	30,6	31,3	6,15
31,6	30,0	31,1	6,17
31,7	30,6	31,0	6,18
31,8	30,5	31,2	6,20
31,9	30,1	31,0	6,21
32,0	30,5	30,9	6,15
32,1	30,5	30,9	6,17
32,2	30,6	30,9	6,18
32,3	30,8	31,1	6,21
32,4	30,5	31,1	6,10
32,4	30,0	31,2	6,13
32,5	30,7	31,3	6,16
32,6	30,3	31,7	6,17
32,7	30,5	32,2	6,20
32,8	30,9	32,2	6,16
32,9	30,5	32,2	6,18
33,0	30,6	32,2	6,21
33,1	30,0	32,0	6,12
33,2	30,0	32,0	6,15
33,3	30,1	32,0	6,17
33,4	30,5	32,0	6,20
33,5	30,2	31,9	6,20
33,6	30,5	32,1	6,04
33,7	30,7	32,4	6,07
33,8	30,5	32,4	6,09
33,9	30,5	32,2	6,12
34,0	30,6	32,2	6,14
34,1	30,6	32,2	6,16
34,2	30,1	32,2	6,18
34,3	30,0	32,2	6,21
34,4	30,6	32,4	6,22
34,5	30,0	32,6	6,10
34,6	30,1	32,4	6,11
34,7	30,7	32,5	6,14
34,8	30,7	33,2	6,16
34,8	30,8	32,7	6,16
34,9	30,5	32,4	6,18
35,0	29,7	32,4	6,21
35,1	29,0	32,1	6,15
35,2	28,3	31,8	6,18
35,3	27,6	31,4	6,20
35,4	27,7	31,1	6,21
35,5	27,5	30,9	6,21

35,6	27,3	30,7	6,15
35,7	27,5	30,4	6,17
35,8	27,5	30,4	6,18
35,9	27,4	30,3	6,18
36,0	27,1	30,2	6,22
36,1	27,3	30,2	6,14
36,2	27,3	30,2	6,16
36,3	27,2	30,1	6,17
36,4	27,3	30,2	6,18
36,5	27,4	30,1	6,20
36,6	27,2	30,1	6,21
36,7	27,4	30,2	6,16
36,8	27,4	30,2	6,17
36,9	27,4	30,3	6,18
37,0	27,5	30,2	6,20
37,1	27,3	30,2	6,21
37,2	27,4	30,3	6,18
37,2	27,4	30,3	6,20
37,3	27,2	30,4	6,21
37,4	27,2	30,4	6,10
37,5	27,3	30,4	6,11
37,6	27,3	30,4	6,12
37,7	27,4	30,5	6,14
37,8	27,6	30,5	6,15
37,9	27,4	30,5	6,16
38,0	27,4	30,4	6,17
38,1	27,4	30,5	6,18
38,2	27,5	30,5	6,20
38,3	27,2	30,5	6,21
38,4	27,1	30,6	6,13
38,5	27,1	30,5	6,14
38,6	27,1	30,5	6,16
38,7	27,3	30,4	6,17
38,8	27,5	31,2	6,17
38,9	27,1	32,7	6,18
39,0	27,0	83,1	6,20
39,1	27,1	33,9	6,15
39,2	27,1	33,7	6,15
39,3	27,2	33,5	6,18
39,4	27,4	33,4	6,17
39,5	27,2	33,2	6,18
39,6	27,1	32,9	6,20
39,6	27,1	32,8	6,21
39,7	27,2	33,6	6,17
39,8	27,2	32,9	6,17
39,9	27,1	43,9	6,18
40,0	27,1	33,5	6,20
40,1	27,2	33,1	6,21

## ANNEXE-6 (suite)

40,2	27,2	33,0	6,11
40,3	27,2	32,9	6,13
40,4	27,1	32,8	6,15
40,5	27,5	32,7	6,16
40,6	27,0	32,6	6,16
40,7	27,1	32,6	6,18
40,8	27,1	32,6	6,18
40,9	27,2	32,6	6,20
41,0	27,3	32,6	6,22
41,1	27,1	32,6	6,21
41,2	27,2	32,6	6,10
41,3	27,0	32,5	6,10
41,4	27,1	32,5	6,12
41,5	27,2	32,5	6,14
41,6	27,1	32,5	6,14
41,7	27,2	32,4	6,15
41,8	27,0	32,4	6,16
41,9	27,1	32,4	6,16
42,0	27,1	32,4	6,17
42,0	27,3	32,4	6,18
42,1	27,1	32,4	6,18
42,2	27,3	32,4	6,20
42,3	27,3	32,4	6,15
42,4	27,1	32,4	6,16
42,5	27,4	32,4	6,17
42,6	27,1	32,4	6,18
42,7	27,5	32,4	6,18
42,8	27,2	32,3	6,18
42,9	27,4	32,3	6,20
43,0	27,2	32,4	6,12
43,1	27,2	32,4	6,14
43,2	27,4	32,4	6,15
43,3	27,4	32,4	6,16
43,4	27,5	32,3	6,17
43,5	27,2	32,4	6,17
43,6	27,3	32,4	6,18
43,7	27,3	32,4	6,21
43,8	27,2	32,4	6,20
43,9	27,1	32,3	6,13
44,0	27,6	32,4	6,15
44,1	27,2	32,4	6,16
44,2	27,4	32,2	6,16
44,3	27,3	32,3	6,17
44,4	27,3	32,2	6,18
44,4	27,5	32,4	6,18
44,5	27,3	32,4	6,20
44,6	27,5	32,2	6,22
44,7	27,5	32,2	6,20

44,8	27,5	32,1	6,22
44,9	27,4	32,0	6,09
45,0	27,4	31,9	6,10
45,1	27,4	31,6	6,11
45,2	27,3	31,6	6,11
45,3	27,3	31,5	6,12
45,4	27,5	31,5	6,14
45,5	27,3	31,3	6,15
45,6	27,2	31,2	6,16
45,7	27,6	31,2	6,16
45,8	27,2	31,2	6,18
45,9	27,2	31,1	6,18
46,0	27,2	31,0	6,20
46,1	27,3	31,0	6,20
46,2	27,4	30,9	6,21
46,3	27,4	31,0	6,15
46,4	27,3	31,0	6,15
46,5	27,3	31,0	6,16
46,6	27,3	31,0	6,17
46,7	27,2	31,0	6,18
46,8	27,3	30,9	6,18
46,8	27,5	30,8	6,20
46,9	27,7	30,7	6,21
47,0	27,3	30,5	6,21
47,1	27,2	30,4	6,18
47,2	27,2	30,4	6,18
47,3	27,3	30,4	6,21
47,4	27,5	30,5	6,15
47,5	27,3	30,6	6,15
47,6	27,5	31,0	6,17
47,7	27,6	31,0	6,17
47,8	27,2	31,0	6,17

## EXPÉRIENCE B

**Tableau 33:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience B :** choc de pH 7->6->7 (15-18 h).

Temps (hres)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / $\mu$ l
	totaux	spores		
0	1,60E+06	3,00E+02	0,0	
3	3,00E+06	2,30E+02	0,0	
6	1,50E+07	3,43E+05	2,3	
9	3,45E+07	3,10E+05	0,9	
12	7,50E+07	6,50E+05	0,9	
15	1,20E+08	2,60E+07	21,7	
16	1,50E+08	1,35E+08	90,0	
18	5,95E+08	5,55E+08	93,3	
21	3,60E+08	2,80E+08	77,8	
24	1,20E+09	9,00E+08	75,0	10529
48	6,75E+08	5,20E+08	77,0	10550

**Tableau 34:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience B :** choc de pH 7->6->7 (15-18 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	30,6	99,7	6,89
0,1	30,8	99,7	6,86
0,2	30,8	99,7	6,84
0,3	31,0	99,7	6,85
0,4	30,4	99,7	6,83
0,5	31,3	99,7	6,82
0,6	31,3	99,8	6,82
0,7	30,8	99,8	6,81
0,8	31,6	99,7	6,80
0,9	30,9	99,8	6,89
1,0	30,9	99,7	6,87
1,1	31,2	99,7	6,86
1,2	30,8	99,7	6,85
1,2	31,0	99,7	6,84
1,3	30,5	99,7	6,82
1,4	31,1	99,7	6,80
1,5	30,5	99,7	6,89
1,6	30,5	99,7	6,87
1,7	31,1	99,7	6,83
1,8	31,2	98,9	6,82
1,9	31,4	97,9	6,80
2,0	31,3	96,8	6,91
2,1	30,5	96,1	6,87
2,2	30,6	95,1	6,83
2,3	30,9	93,8	6,82
2,4	30,8	92,9	6,78
2,5	31,1	91,4	6,87
2,6	31,2	89,8	6,83
2,7	30,8	89,0	6,80
2,8	30,8	88,8	6,89
2,9	31,2	87,3	6,85
3,0	31,9	86,1	6,83
3,1	31,3	84,5	6,80
3,2	31,3	82,8	6,85
3,3	32,2	80,6	6,82
3,4	31,6	78,7	6,80
3,5	31,2	75,6	6,89
3,6	31,5	72,6	6,86
3,6	31,3	72,0	6,82
3,7	31,1	72,6	6,80
3,8	30,7	68,2	6,86
3,9	31,2	64,5	6,80
4,0	31,6	59,9	6,81
4,1	30,6	56,1	6,84
4,2	31,6	50,1	6,80
4,3	31,0	42,8	6,83
4,4	30,6	37,5	6,80
4,5	31,4	31,9	6,80
4,6	31,0	26,3	6,80
4,7	31,1	16,8	6,80
4,8	31,6	6,1	6,82
4,9	31,3	1,7	6,86
5,0	31,5	0,6	6,89
5,1	30,6	0,0	6,94
5,2	30,9	0,0	6,99
5,3	31,5	0,0	7,03
5,4	31,6	0,0	7,08
5,5	31,5	0,0	7,11
5,6	30,6	0,0	7,14
5,7	31,6	0,0	7,18
5,8	30,8	0,0	7,21
5,9	31,3	0,2	7,16
6,0	31,5	0,0	7,17
6,0	32,2	0,0	7,16
6,1	32,0	0,0	7,15
6,2	31,2	0,0	7,20
6,3	31,7	0,0	7,17
6,4	31,8	0,0	7,12
6,5	32,0	0,0	7,20
6,6	31,6	0,0	7,18
6,7	31,9	0,0	7,20
6,8	31,5	0,0	7,20
6,9	31,9	0,0	7,20
7,0	32,3	0,0	7,15
7,1	31,8	0,0	7,13
7,2	30,9	0,0	7,14
7,3	31,3	0,0	7,17
7,4	30,9	0,0	7,15
7,5	30,9	0,0	7,21
7,6	31,2	0,0	7,15
7,7	31,1	0,0	7,20
7,8	31,0	0,0	7,19
7,9	31,1	0,0	7,17
8,0	31,0	0,0	7,17
8,1	31,0	0,0	7,06
8,2	31,2	0,0	7,17

## ANNEXE-7 (suite)

8,3	31,7	0,0	7,07
8,4	31,6	0,0	7,16
8,4	31,1	1,8	7,17
8,5	30,9	0,1	7,12
8,6	30,8	7,1	7,21
8,7	30,9	0,0	7,13
8,8	31,0	0,0	7,21
8,9	32,2	0,0	7,10
9,0	31,8	0,0	7,18
9,1	31,8	0,0	7,16
9,2	32,1	0,0	7,16
9,3	31,6	0,0	7,17
9,4	31,2	0,0	7,10
9,5	31,9	0,0	7,17
9,6	31,5	0,0	7,12
9,7	31,2	0,0	7,21
9,8	31,3	0,0	7,21
9,9	31,5	0,0	7,19
10,0	30,8	0,0	7,17
10,1	30,8	0,0	7,12
10,2	32,1	0,0	7,20
10,3	30,7	0,0	7,15
10,4	31,1	0,0	7,20
10,5	31,0	0,0	7,18
10,6	31,7	0,0	7,21
10,7	30,7	0,8	7,17
10,8	30,7	2,4	7,22
10,8	31,2	3,6	7,17
10,9	31,5	6,1	7,14
11,0	31,7	6,6	7,21
11,1	31,3	10,5	7,20
11,2	30,6	11,1	7,21
11,3	31,0	12,5	7,20
11,4	31,3	13,1	7,15
11,5	31,6	6,5	7,19
11,6	31,2	6,9	7,20
11,7	32,1	6,3	7,15
11,8	31,1	3,7	7,19
11,9	31,9	2,3	7,21
12,0	32,4	0,8	7,14
12,1	32,8	0,3	7,19
12,2	31,9	0,1	7,21
12,3	32,9	0,0	7,21
12,4	31,6	0,0	7,17
12,5	32,1	0,0	7,20
12,6	32,4	0,7	7,14
12,7	32,3	1,4	7,19
12,8	31,6	2,2	7,21

12,9	31,2	4,2	7,17
13,0	31,7	4,5	7,14
13,1	31,2	6,0	7,20
13,2	31,2	7,3	7,20
13,2	31,2	6,9	7,19
13,3	31,2	7,3	7,15
13,4	31,2	9,8	7,21
13,5	31,7	8,5	7,14
13,6	31,0	10,7	7,19
13,7	31,5	12,1	7,16
13,8	31,5	12,3	7,21
13,9	31,0	13,8	7,22
14,0	31,8	11,9	7,11
14,1	30,9	14,2	7,17
14,2	31,7	16,1	7,21
14,3	30,9	15,6	7,18
14,4	31,2	17,0	7,21
14,5	31,2	17,0	7,13
14,6	31,6	17,9	7,17
14,7	31,8	24,0	6,16
14,8	32,2	22,6	6,18
14,9	32,0	22,9	6,11
15,0	32,0	24,2	6,21
15,1	32,8	27,4	6,07
15,2	31,7	28,1	6,16
15,3	32,1	29,9	6,18
15,4	31,5	31,2	6,15
15,5	31,9	31,2	6,20
15,6	32,2	32,1	6,11
15,6	30,9	31,9	6,16
15,7	31,2	33,4	6,16
15,8	31,4	31,9	6,15
15,9	31,5	32,3	6,12
16,0	31,5	31,6	6,16
16,1	31,7	32,4	6,06
16,2	31,8	32,6	6,10
16,3	31,4	33,0	6,14
16,4	32,3	33,4	6,06
16,5	31,4	34,4	6,10
16,6	32,0	35,4	6,15
16,7	31,2	35,1	6,14
16,8	31,1	36,1	6,07
16,9	30,9	36,5	6,11
17,0	31,3	37,0	6,15
17,1	31,5	38,2	6,10
17,2	30,6	38,2	6,15
17,3	31,5	39,1	6,11
17,4	31,7	38,7	6,13

17,5	31,1	39,5	6,07
17,6	32,0	41,9	6,11
17,7	31,5	33,0	6,84
17,8	31,5	36,4	6,79
17,9	31,6	37,2	6,87
18,0	31,7	36,9	6,84
18,0	31,8	39,3	6,84
18,1	31,6	41,0	6,84
18,2	31,7	42,0	6,83
18,3	32,2	43,0	6,85
18,4	31,9	43,2	6,86
18,5	32,0	43,3	6,86
18,6	32,1	44,4	6,87
18,7	32,3	44,8	6,88
18,8	32,2	45,4	6,89
18,9	32,7	45,9	6,91
19,0	31,6	46,3	6,92
19,1	31,7	46,7	6,92
19,2	31,6	47,3	6,93
19,3	31,6	47,8	6,95
19,4	32,0	47,2	6,96
19,5	31,0	47,9	6,98
19,6	31,2	48,2	7,00
19,7	30,7	48,5	7,01
19,8	31,9	48,3	7,01
19,9	31,8	48,8	7,04
20,0	31,3	49,6	7,06
20,1	31,2	50,4	7,08
20,2	31,5	51,2	7,09
20,3	31,5	51,1	7,10
20,4	31,7	51,6	7,11
20,4	31,8	51,9	7,13
20,5	31,4	52,8	7,14
20,6	31,0	53,5	7,16
20,7	31,2	53,6	7,16
20,8	31,5	54,2	7,17
20,9	31,1	54,3	7,19
21,0	31,4	54,4	7,20
21,1	32,3	55,1	7,15
21,2	31,7	55,5	7,17
21,3	31,5	55,7	7,20
21,4	32,3	56,0	7,14
21,5	31,6	56,7	7,18
21,6	31,6	57,3	7,20
21,7	31,2	57,5	7,20
21,8	31,0	57,9	7,17
21,9	31,1	58,7	7,19
22,0	31,4	59,2	7,21

22,1	30,8	58,9	7,14
22,2	31,4	59,5	7,17
22,3	31,0	60,4	7,19
22,4	31,5	61,0	7,21
22,5	30,4	61,3	7,16
22,6	30,7	61,8	7,19
22,7	30,6	62,2	7,20
22,8	31,3	62,8	7,17
22,8	31,4	63,0	7,19
22,9	31,0	63,7	7,20
23,0	30,6	63,5	7,20
23,1	31,2	63,8	7,15
23,2	30,6	64,0	7,17
23,3	30,8	64,2	7,19
23,4	30,7	64,6	7,18
23,5	31,5	64,5	7,20
23,6	31,7	64,8	7,21
23,7	31,9	64,4	7,21
23,8	31,1	64,2	7,20
23,9	31,0	64,5	7,20
24,0	31,7	65,0	7,21
24,1	30,8	64,7	7,14
24,2	31,0	65,5	7,16
24,3	31,6	65,5	7,16
24,4	31,2	65,7	7,17
24,5	31,7	65,4	7,18
24,6	31,0	65,6	7,20
24,7	31,3	65,7	7,20
24,8	31,3	65,9	7,20
24,9	30,8	65,6	7,21
25,0	30,8	65,3	7,17
25,1	31,0	66,0	7,17
25,2	30,6	66,1	7,19
25,2	30,8	66,0	7,19
25,3	31,3	66,1	7,20
25,4	30,6	66,2	7,20
25,5	31,4	65,9	7,20
25,6	30,7	66,4	7,22
25,7	31,1	66,2	7,21
25,8	31,1	66,2	7,21
25,9	30,8	65,4	7,14
26,0	30,6	66,1	7,14
26,1	31,0	66,3	7,15
26,2	30,4	66,3	7,17
26,3	30,5	66,4	7,16
26,4	30,7	66,5	7,18
26,5	31,2	66,5	7,18
26,6	31,1	66,5	7,18

26,7	31,3	66,5	7,17
26,8	30,5	66,5	7,19
26,9	31,0	66,5	7,19
27,0	30,6	66,4	7,20
27,1	31,4	66,8	7,20
27,2	30,8	66,5	7,19
27,3	30,9	66,5	7,20
27,4	30,9	66,9	7,21
27,5	30,8	67,0	7,19
27,6	30,9	67,0	7,20
27,6	31,0	67,0	7,20
27,7	30,6	67,3	7,20
27,8	30,6	67,0	7,15
27,9	30,5	67,4	7,16
28,0	31,6	67,4	7,17
28,1	30,7	67,5	7,17
28,2	30,7	67,4	7,19
28,3	31,2	67,8	7,19
28,4	30,7	67,8	7,20
28,5	30,9	67,8	7,20
28,6	31,1	67,7	7,19
28,7	30,5	67,7	7,20
28,8	30,7	67,9	7,20
28,9	30,5	68,0	7,20
29,0	30,7	68,0	7,21
29,1	30,9	67,8	7,20
29,2	31,2	67,8	7,20
29,3	31,3	67,9	7,21
29,4	30,5	67,7	7,14
29,5	31,1	67,9	7,15
29,6	31,1	67,9	7,16
29,7	31,2	67,8	7,17
29,8	31,1	67,9	7,17
29,9	31,0	67,7	7,17
30,0	30,8	68,0	7,18
30,0	31,0	68,0	7,19
30,1	30,9	67,9	7,20
30,2	30,6	68,1	7,20
30,3	30,8	67,9	7,20
30,4	31,6	68,1	7,20
30,5	30,6	68,1	7,21
30,6	31,2	68,3	7,20
30,7	30,2	68,1	7,21
30,8	30,2	68,0	7,20
30,9	30,7	67,9	7,21
31,0	30,7	67,5	7,08
31,1	31,3	67,9	7,09
31,2	31,0	67,9	7,11

31,3	30,6	67,9	7,13
31,4	30,5	68,1	7,14
31,5	30,6	68,0	7,14
31,6	30,7	67,8	7,14
31,7	30,9	67,9	7,15
31,8	31,3	67,8	7,14
31,9	30,6	67,8	7,15
32,0	30,7	67,8	7,17
32,1	31,1	67,7	7,17
32,2	30,7	67,8	7,17
32,3	31,2	67,8	7,17
32,4	31,4	68,0	7,17
32,4	31,4	68,0	7,19
32,5	31,1	68,1	7,20
32,6	30,8	68,0	7,20
32,7	30,7	68,1	7,20
32,8	31,1	68,0	7,21
32,9	31,6	68,0	7,21
33,0	31,5	67,9	7,19
33,1	31,8	68,2	7,20
33,2	31,3	68,1	7,20
33,3	30,6	68,0	7,22
33,4	31,1	68,0	7,16
33,5	31,3	67,9	7,17
33,6	31,3	68,0	7,19
33,7	30,8	68,1	7,19
33,8	30,8	68,1	7,19
33,9	30,9	68,1	7,22
34,0	30,9	68,2	7,21
34,1	30,5	68,1	7,13
34,2	30,9	68,5	7,14
34,3	31,1	68,5	7,14
34,4	31,4	68,6	7,15
34,5	31,5	68,5	7,16
34,6	31,2	68,5	7,17
34,7	31,0	68,5	7,17
34,8	30,8	68,6	7,20
34,8	31,3	68,6	7,19
34,9	31,5	68,4	7,20
35,0	31,1	68,5	7,21
35,1	31,4	68,5	7,21
35,2	30,7	68,6	7,15
35,3	30,7	68,4	7,15
35,4	31,8	68,5	7,16
35,5	31,0	68,6	7,18
35,6	31,2	68,5	7,19
35,7	31,8	68,6	7,19
35,8	31,4	68,6	7,20

35,9	30,9	68,6	7,20
36,0	31,0	68,6	7,20
36,1	30,9	68,7	7,20
36,2	30,9	68,2	7,12
36,3	31,1	68,5	7,13
36,4	31,4	68,8	7,14
36,5	31,4	68,8	7,16
36,6	31,3	68,9	7,15
36,7	30,7	68,9	7,17
36,8	30,7	68,9	7,17
36,9	31,0	68,8	7,18
37,0	31,5	68,8	7,19
37,1	31,3	68,8	7,18
37,2	30,9	68,9	7,17
37,2	31,0	68,8	7,19
37,3	30,6	68,7	7,20
37,4	30,8	68,7	7,20
37,5	30,9	68,7	7,21
37,6	30,9	68,8	7,20
37,7	30,6	68,6	7,20
37,8	31,4	68,6	7,21
37,9	31,0	68,5	7,21
38,0	31,0	68,5	7,21
38,1	31,3	68,5	7,22
38,2	31,2	68,5	7,15
38,3	30,9	68,5	7,16
38,4	31,3	68,4	7,17
38,5	31,3	68,6	7,17
38,6	31,8	68,3	7,18
38,7	31,4	68,3	7,18
38,8	31,2	68,4	7,18
38,9	30,6	68,4	7,19
39,0	31,2	68,3	7,19
39,1	31,3	68,2	7,20
39,2	31,0	68,3	7,20
39,3	30,8	68,3	7,20
39,4	30,9	68,3	7,20
39,5	31,5	68,3	7,21
39,6	31,2	68,2	7,20
39,6	30,9	68,2	7,21
39,7	31,0	68,1	7,20
39,8	31,1	68,0	7,21
39,9	30,6	68,0	7,20
40,0	30,6	68,0	7,20
40,1	31,0	68,1	7,20
40,2	31,3	67,7	7,13
40,3	30,4	67,8	7,13
40,4	30,6	67,8	7,13

40,5	31,3	67,9	7,13
40,6	31,2	68,0	7,14
40,7	30,8	67,8	7,14
40,8	31,4	67,8	7,14
40,9	31,6	67,9	7,15
41,0	31,2	67,8	7,15
41,1	31,5	67,7	7,14
41,2	30,7	67,8	7,14
41,3	31,2	67,7	7,15
41,4	30,7	67,7	7,15
41,5	31,3	67,6	7,15
41,6	31,5	67,5	7,15
41,7	30,9	67,5	7,15
41,8	30,5	67,5	7,15
41,9	30,7	67,5	7,15
42,0	30,7	67,4	7,15
42,0	30,7	67,4	7,16
42,1	30,8	67,4	7,17
42,2	31,4	67,4	7,16
42,3	31,2	67,5	7,16
42,4	30,5	67,4	7,15
42,5	30,8	67,3	7,17
42,6	30,6	67,3	7,17
42,7	31,3	67,3	7,17
42,8	31,3	67,3	7,16
42,9	31,3	67,2	7,16
43,0	31,1	67,2	7,17
43,1	31,2	67,3	7,16
43,2	31,2	67,1	7,17
43,3	30,6	67,1	7,16
43,4	31,2	67,1	7,17
43,5	30,6	67,0	7,17
43,6	31,1	67,0	7,17
43,7	30,2	67,0	7,16
43,8	31,6	67,0	7,17
43,9	31,3	67,0	7,17
44,0	31,1	67,0	7,17
44,1	30,8	66,9	7,17
44,2	30,9	67,3	7,17
44,3	30,3	66,8	7,18
44,4	30,8	66,8	7,17
44,4	30,5	66,6	7,17
44,5	30,5	66,5	7,17
44,6	31,0	66,3	7,17
44,7	30,6	66,2	7,17
44,8	31,3	66,2	7,17
44,9	30,6	66,3	7,17
45,0	30,7	66,3	7,17

45,1	31,0	66,2	7,17
45,2	31,2	66,2	7,17
45,3	31,3	66,2	7,17
45,4	31,1	66,1	7,17
45,5	31,1	66,2	7,17
45,6	30,8	66,1	7,17
45,7	31,2	66,0	7,18
45,8	30,7	66,0	7,19
45,9	30,7	66,0	7,19
46,0	31,3	65,8	7,17
46,1	30,6	66,0	7,19
46,2	30,7	65,8	7,19
46,3	31,1	65,7	7,19
46,4	30,7	65,9	7,19
46,5	31,1	65,8	7,19
46,6	30,8	65,7	7,19
46,7	30,6	65,6	7,19
46,8	30,7	65,7	7,19
46,8	30,5	65,7	7,19
46,9	30,3	65,8	7,19
47,0	30,6	65,7	7,20
47,1	31,2	65,6	7,21
47,2	30,9	65,6	7,20
47,3	30,5	65,6	7,19
47,4	31,3	66,1	7,19
47,5	31,3	66,3	7,19
47,6	31,6	66,5	7,20
47,7	31,7	66,6	7,20
47,8	32,0	66,6	7,20

## EXPÉRIENCE C

**Tableau 35:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience C :** 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h).

Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	1,80E+06	7,25E+03	0,4	
3	5,20E+06	2,10E+04	0,4	
6	2,00E+07	6,65E+04	0,3	
9	7,30E+07	1,76E+05	0,2	
12	7,80E+07	3,10E+06	4,0	
15	3,20E+08	1,20E+08	37,5	
16	3,50E+08	3,35E+08	95,7	
18	4,60E+08	3,90E+08	84,8	
21	5,20E+08	3,15E+08	60,6	
24	5,00E+08	3,30E+08	66,0	11908
25	3,10E+08	2,80E+08	90,3	
27	6,70E+08	5,10E+08	76,1	
30	7,60E+08	6,20E+08	81,6	12701
36	7,45E+08	6,35E+08	85,2	11835
48	9,70E+08	8,60E+08	88,7	11447

**Tableau 36:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience C :** 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	30,6	99,7	6,79
0,1	30,5	99,7	6,82
0,2	30,6	99,7	6,81
0,3	30,7	99,7	6,80
0,4	30,6	99,7	6,80
0,5	30,9	99,7	6,79
0,6	30,9	99,7	6,81
0,7	31,0	99,7	6,81
0,8	31,0	99,7	6,80
0,9	31,0	99,7	6,78
1,0	30,9	99,7	6,78
1,1	31,1	99,7	6,78
1,2	30,9	99,7	6,80
1,2	30,8	99,7	6,79
1,3	31,0	99,7	6,80
1,4	30,7	99,7	6,78
1,5	30,9	99,7	6,80

1,6	30,8	99,7	6,80
1,7	30,5	99,7	6,80
1,8	30,6	99,7	6,80
1,9	30,7	99,7	6,78
2,0	30,6	99,7	6,80
2,1	30,7	99,7	6,80
2,2	30,8	99,7	6,82
2,3	30,5	99,7	6,80
2,4	30,8	99,7	6,79
2,5	30,6	99,7	6,75
2,6	30,7	99,7	6,82
2,7	30,7	99,7	6,83
2,8	30,9	99,7	6,81
2,9	31,0	95,7	6,77
3,0	31,0	92,8	6,75
3,1	31,0	80,1	6,74
3,2	30,9	72,5	7,08
3,3	31,0	73,3	7,00
3,4	31,2	73,4	6,93

3,5	31,1	74,1	6,87
3,6	30,9	70,1	6,87
3,6	31,4	53,7	7,06
3,7	31,2	62,7	6,96
3,8	31,3	49,9	6,88
3,9	31,3	40,0	6,86
4,0	31,3	22,2	6,83
4,1	31,5	8,6	6,83
4,2	31,3	3,3	7,05
4,3	31,5	4,5	7,05
4,4	31,6	3,0	7,08
4,5	31,5	40,2	7,12
4,6	31,7	11,6	7,18
4,7	31,6	6,5	7,22
4,8	31,8	25,6	7,09
4,9	31,6	29,2	7,20
5,0	31,5	4,5	7,21
5,1	31,7	19,5	7,11
5,2	31,2	30,7	7,20

5,3	31,9	27,5	7,21
5,4	31,7	22,0	7,20
5,5	31,9	16,4	7,19
5,6	31,7	18,6	7,20
5,7	31,6	13,2	7,18
5,8	31,8	4,7	7,17
5,9	31,8	3,1	7,22
6,0	31,9	2,5	7,17
6,0	31,4	3,1	7,17
6,1	31,5	2,7	7,19
6,2	31,2	3,7	7,15
6,3	31,2	6,0	7,17
6,4	30,9	9,2	7,22
6,5	30,9	13,4	7,21
6,6	31,0	15,4	7,21
6,7	31,0	18,0	7,20
6,8	31,1	17,2	7,21
6,9	31,0	19,5	7,21
7,0	31,0	20,8	7,17

## ANNEXE-8 (suite)

7,1	31,2	21,5	7,21
7,2	30,9	21,0	7,21
7,3	31,1	21,6	7,21
7,4	31,2	12,1	7,19
7,5	31,1	10,5	7,17
7,6	31,1	12,7	7,15
7,7	31,0	16,5	7,15
7,8	31,1	18,4	7,20
7,9	31,1	22,0	7,20
8,0	31,0	25,5	7,18
8,1	30,8	28,2	7,15
8,2	31,1	30,1	7,22
8,3	31,1	34,5	7,19
8,4	30,9	43,9	7,17
8,4	31,1	56,6	7,20
8,5	31,1	62,0	7,15
8,6	30,9	64,9	7,18
8,7	30,8	65,9	7,11
8,8	30,8	68,3	7,19
8,9	30,9	70,1	7,17
9,0	31,1	0,4	7,13
9,1	31,3	0,1	7,13
9,2	31,3	0,0	7,12
9,3	31,3	0,0	7,11
9,4	31,4	0,0	7,11
9,5	31,3	40,9	7,14
9,6	31,2	51,8	7,17
9,7	31,5	52,9	7,19
9,8	31,3	53,1	7,20
9,9	31,3	49,8	7,20
10,0	31,3	53,2	7,14
10,1	30,9	48,8	7,17
10,2	31,0	58,5	7,18
10,3	31,0	55,8	7,20
10,4	30,9	58,6	7,20
10,5	31,0	64,2	7,21
10,6	30,9	64,8	7,15
10,7	30,8	65,6	7,17
10,8	30,9	64,6	7,19
10,8	30,8	63,2	7,20
10,9	30,7	62,9	7,20
11,0	30,9	69,0	7,20
11,1	30,8	68,5	7,20
11,2	31,1	71,9	7,20
11,3	30,7	73,1	7,14
11,4	30,9	72,1	7,16
11,5	30,9	73,9	7,17
11,6	30,7	75,9	7,18

11,7	30,8	75,2	7,17
11,8	31,0	75,4	7,17
11,9	31,1	73,5	7,17
12,0	31,3	75,4	7,17
12,1	31,4	74,3	7,17
12,2	31,3	73,8	7,17
12,3	31,3	77,8	7,16
12,4	31,2	74,1	7,16
12,5	31,5	76,9	7,17
12,6	31,3	80,3	7,17
12,7	31,1	79,8	7,17
12,8	31,4	80,9	7,17
12,9	31,4	81,6	7,17
13,0	31,3	80,9	7,18
13,1	31,4	82,0	7,18
13,2	31,4	80,3	7,19
13,2	31,3	81,8	7,19
13,3	31,4	85,2	7,20
13,4	31,3	83,8	7,20
13,5	31,1	86,2	7,21
13,6	31,1	87,2	7,14
13,7	31,3	88,9	7,17
13,8	31,3	90,3	7,17
13,9	31,2	89,6	7,19
14,0	31,1	88,9	7,20
14,1	31,2	90,9	7,21
14,2	31,1	90,3	7,17
14,3	31,1	91,6	7,18
14,4	30,9	92,2	7,20
14,5	31,0	92,1	7,15
14,6	31,0	95,0	7,16
14,7	31,1	93,9	7,18
14,8	31,1	94,5	7,20
14,9	31,0	95,1	5,99
15,0	31,3	97,1	6,08
15,1	31,2	96,6	6,07
15,2	31,3	97,2	6,01
15,3	31,3	98,6	6,10
15,4	31,2	99,7	6,05
15,5	31,0	99,7	6,10
15,6	31,1	99,7	6,06
15,6	31,1	99,7	6,01
15,7	31,3	99,7	6,07
15,8	31,1	99,7	6,11
15,9	30,6	99,7	6,04
16,0	30,1	99,7	6,09
16,1	30,0	99,7	6,07
16,2	29,9	99,7	6,11

16,3	30,0	99,7	6,03
16,4	30,0	99,7	6,04
16,5	29,7	99,7	6,08
16,6	29,8	99,7	5,99
16,7	29,7	93,0	6,02
16,8	29,7	91,9	6,05
16,9	29,6	93,0	6,07
17,0	29,5	93,8	6,10
17,1	29,3	95,2	6,05
17,2	29,7	95,4	6,07
17,3	29,5	95,9	6,11
17,4	29,6	97,2	6,00
17,5	29,3	98,2	6,03
17,6	29,4	98,4	6,05
17,7	29,3	99,1	6,08
17,8	29,4	99,3	6,10
17,9	29,4	99,7	5,91
18,0	29,7	99,7	5,95
18,0	29,7	99,7	5,99
18,1	29,5	99,8	6,02
18,2	29,6	99,4	6,94
18,3	29,7	99,7	6,91
18,4	29,5	99,8	6,88
18,5	29,5	99,7	6,88
18,6	29,5	99,7	6,87
18,7	29,4	99,8	6,88
18,8	29,4	99,7	6,88
18,9	29,3	99,7	6,89
19,0	29,3	99,7	6,91
19,1	29,4	99,7	6,91
19,2	29,2	99,7	6,93
19,3	29,2	99,7	6,94
19,4	29,5	99,7	6,94
19,5	29,3	99,8	6,96
19,6	29,3	99,7	6,96
19,7	29,3	99,7	6,98
19,8	29,3	99,8	6,98
19,9	29,3	99,8	7,01
20,0	29,2	99,7	7,02
20,1	29,3	99,8	7,01
20,2	29,3	99,7	7,03
20,3	29,3	99,8	7,04
20,4	29,2	99,8	7,04
20,4	29,5	99,7	7,06
20,5	29,4	99,8	7,07
20,6	29,3	99,8	7,06
20,7	29,5	99,7	7,07
20,8	29,6	99,6	7,07

20,9	29,6	99,7	7,08
21,0	29,7	99,7	7,09
21,1	29,5	99,8	7,09
21,2	29,6	99,7	7,09
21,3	29,6	99,8	7,11
21,4	29,6	99,7	7,11
21,5	29,5	99,7	7,11
21,6	29,5	99,7	7,13
21,7	29,5	99,7	7,13
21,8	29,3	99,7	7,14
21,9	29,3	99,7	7,14
22,0	29,2	99,7	7,15
22,1	29,5	99,7	7,15
22,2	30,1	99,7	7,14
22,3	30,1	99,7	7,14
22,4	29,9	99,7	7,15
22,5	30,0	99,7	7,15
22,6	29,9	99,7	7,15
22,7	29,8	99,7	7,15
22,8	29,9	99,7	7,16
22,8	29,9	99,7	7,15
22,9	29,9	99,7	7,16
23,0	30,1	99,7	7,16
23,1	29,9	99,7	7,17
23,2	29,9	99,7	7,16
23,3	30,1	99,7	7,16
23,4	30,0	99,7	7,16
23,5	30,0	99,7	7,16
23,6	30,1	99,7	7,16
23,7	30,4	99,7	7,16
23,8	30,8	99,7	5,84
23,9	31,1	99,7	5,96
24,0	31,1	99,7	6,01
24,1	31,2	99,7	6,01
24,2	31,1	99,7	6,05
24,3	30,7	99,7	6,08
24,4	31,0	99,7	6,08
24,5	30,7	99,7	6,10
24,6	30,7	99,7	6,11
24,7	30,9	99,7	6,03
24,8	30,7	99,7	6,05
24,9	30,8	99,7	6,06
25,0	31,1	99,7	6,08
25,1	31,1	99,7	6,07
25,2	31,1	99,7	6,10
25,2	31,2	99,7	6,10
25,3	31,2	99,7	6,10
25,4	31,1	99,7	6,11

25,5	30,8	99,7	6,11
25,6	30,8	99,7	6,01
25,7	30,8	99,7	6,01
25,8	30,6	99,7	6,03
25,9	30,6	99,8	6,04
26,0	30,7	99,7	6,04
26,1	30,6	99,7	6,06
26,2	30,8	99,7	6,07
26,3	30,6	99,7	6,07
26,4	30,7	99,7	6,08
26,5	30,5	99,7	6,07
26,6	30,8	99,7	6,09
26,7	30,8	99,7	6,10
26,8	30,9	99,8	6,10
26,9	30,9	99,7	6,11
27,0	30,9	99,7	6,11
27,1	31,2	99,7	6,06
27,2	31,1	99,7	6,06
27,3	31,1	99,7	6,08
27,4	31,0	99,8	6,08
27,5	31,1	99,7	7,01
27,6	31,1	99,7	6,95
27,6	31,0	99,7	6,93
27,7	31,0	99,7	6,91
27,8	30,9	99,7	6,91
27,9	31,0	99,7	6,89
28,0	30,9	99,7	6,89
28,1	30,8	99,7	6,91
28,2	30,8	99,7	6,89
28,3	30,7	99,7	6,89
28,4	30,6	99,7	6,89
28,5	30,7	99,7	6,89
28,6	30,6	99,7	6,91
28,7	30,7	99,7	6,89
28,8	31,0	99,7	6,91
28,9	30,7	99,7	6,89
29,0	30,6	99,7	6,89
29,1	30,9	99,7	6,90
29,2	30,7	99,7	6,91
29,3	30,6	97,4	6,89
29,4	30,8	99,7	6,89
29,5	30,8	99,7	6,89
29,6	30,7	99,7	6,89
29,7	31,1	99,7	6,91
29,8	31,0	99,7	6,91
29,9	31,1	99,7	6,92
30,0	31,2	99,7	6,92
30,0	31,2	99,7	6,92

30,1	31,2	99,7	6,92
30,2	31,1	99,7	6,92
30,3	31,0	99,7	6,93
30,4	31,0	99,7	6,92
30,5	30,9	99,7	6,94
30,6	31,0	99,7	6,94
30,7	30,8	99,7	6,94
30,8	30,8	99,7	6,95
30,9	30,7	99,8	6,94
31,0	30,8	99,7	6,95
31,1	30,7	99,8	6,95
31,2	30,8	99,7	6,97
31,3	30,6	99,7	6,96
31,4	30,6	99,7	6,96
31,5	30,8	99,8	6,97
31,6	30,8	99,8	6,96
31,7	30,6	99,8	6,96
31,8	30,7	99,8	6,98
31,9	30,7	99,7	6,98
32,0	30,6	99,7	6,98
32,1	30,6	99,8	6,98
32,2	30,6	99,7	6,98
32,3	30,6	99,7	6,98
32,4	30,7	99,7	6,99
32,4	30,7	99,7	7,00
32,5	30,6	99,7	6,99
32,6	30,7	99,7	6,99
32,7	30,8	99,8	6,99
32,8	30,8	99,7	6,99
32,9	30,7	99,7	7,01
33,0	30,6	99,8	7,01
33,1	30,7	99,7	7,01
33,2	30,8	99,8	7,00
33,3	30,7	99,8	7,01
33,4	30,7	99,8	7,01
33,5	30,7	99,7	7,00
33,6	30,6	99,8	7,01
33,7	30,7	99,8	7,01
33,8	30,7	99,7	7,02
33,9	30,6	99,7	7,01
34,0	30,7	99,7	7,02
34,1	30,6	99,7	7,01
34,2	30,6	99,7	7,01
34,3	30,7	99,7	7,02
34,4	30,6	99,8	7,02
34,5	30,9	99,7	7,02
34,6	30,6	99,8	7,02
34,7	30,8	99,7	7,03

34,8	30,7	99,7	7,02
34,8	30,6	99,7	7,02
34,9	30,8	99,7	7,01
35,0	30,7	99,7	7,03
35,1	30,7	99,7	7,03
35,2	30,6	99,7	7,01
35,3	30,9	99,8	7,02
35,4	30,6	99,7	7,02
35,5	30,6	99,7	7,02
35,6	30,7	99,7	7,03
35,7	30,6	99,7	7,03
35,8	30,8	99,8	7,02
35,9	30,7	99,7	7,03
36,0	30,6	99,7	7,03
36,1	30,6	99,7	7,03
36,2	30,9	99,7	7,02
36,3	30,8	99,7	7,03
36,4	30,8	99,7	7,03
36,5	30,7	99,7	7,03
36,6	30,7	99,7	7,03
36,7	30,6	99,7	7,01
36,8	30,8	99,7	7,03
36,9	30,6	99,8	7,03
37,0	30,7	99,7	7,03
37,1	30,8	99,7	7,03
37,2	30,7	99,7	7,03
37,2	30,8	99,8	7,03
37,3	30,7	99,7	7,03
37,4	31,0	99,7	7,03
37,5	30,8	99,7	7,03
37,6	30,8	99,7	7,03
37,7	30,7	99,7	7,03
37,8	30,9	99,7	7,03
37,9	30,6	99,7	7,03
38,0	30,8	99,7	7,03
38,1	30,7	99,7	7,03
38,2	30,6	99,8	7,04
38,3	30,7	99,8	7,03
38,4	30,6	99,8	7,03
38,5	30,7	99,8	7,04
38,6	30,8	99,8	7,03
38,7	30,7	99,8	7,03
38,8	30,8	99,7	7,03
38,9	30,7	99,8	7,03
39,0	30,7	99,7	7,03
39,1	30,6	99,7	7,03
39,2	30,6	99,8	7,03
39,3	30,6	99,7	7,03

39,4	30,8	99,8	7,03
39,5	30,8	99,7	7,03
39,6	30,8	99,7	7,04
39,6	30,7	99,7	7,03
39,7	30,8	99,7	7,04
39,8	30,6	99,7	7,03
39,9	30,8	99,8	7,04
40,0	30,8	99,8	7,03
40,1	30,7	99,7	7,03
40,2	30,8	99,7	7,03
40,3	30,7	99,7	7,03
40,4	31,0	99,7	7,03
40,5	31,0	99,7	7,03
40,6	30,8	99,8	7,04
40,7	30,7	99,7	7,04
40,8	30,8	99,7	7,03
40,9	30,8	99,7	7,04
41,0	30,8	99,8	7,04
41,1	30,7	99,7	7,04
41,2	30,7	99,7	7,04
41,3	30,8	99,8	7,04
41,4	30,6	99,8	7,04
41,5	30,7	99,8	7,04
41,6	30,8	99,8	7,03
41,7	30,7	99,8	7,04
41,8	30,8	99,8	7,04
41,9	30,7	99,8	7,04
42,0	30,6	99,8	7,05
42,0	30,7	99,7	7,04
42,1	30,6	99,7	7,04
42,2	30,6	99,7	7,03
42,3	30,6	99,7	7,04
42,4	30,8	99,7	7,04
42,5	30,6	99,8	7,04
42,6	30,7	99,7	7,05
42,7	30,7	99,7	7,04
42,8	30,7	99,8	7,05
42,9	30,7	99,7	7,04
43,0	30,7	99,7	7,04
43,1	30,6	99,7	7,05
43,2	30,7	99,8	7,05
43,3	30,7	99,8	7,04
43,4	30,8	99,7	7,04
43,5	30,8	99,7	7,04
43,6	30,8	99,8	7,05
43,7	30,8	99,7	7,06
43,8	30,7	99,8	7,04
43,9	30,8	99,7	7,04

44,0	30,6	99,7	7,04
44,1	30,7	99,7	7,06
44,2	30,8	99,8	7,07
44,3	30,7	99,8	7,05
44,4	30,7	99,7	7,06
44,4	30,8	99,7	7,06
44,5	30,7	99,7	7,06
44,6	30,6	99,8	7,06
44,7	30,7	99,7	7,06
44,8	30,7	99,7	7,06
44,9	31,0	99,7	7,07
45,0	30,7	99,7	7,06
45,1	30,7	99,7	7,06
45,2	30,7	99,7	7,07
45,3	30,8	99,7	7,07
45,4	30,6	99,8	7,07
45,5	30,7	99,8	7,06
45,6	30,7	99,7	7,06
45,7	30,7	99,8	7,06
45,8	30,9	99,7	7,06
45,9	30,8	99,8	7,06
46,0	30,6	99,7	7,06
46,1	30,8	99,7	7,06
46,2	30,7	99,8	7,07
46,3	30,7	99,8	7,07
46,4	30,6	99,7	7,06
46,5	30,7	99,7	7,08
46,6	30,9	99,7	7,08
46,7	30,8	99,7	7,10
46,8	30,8	99,7	7,10
46,8	30,8	99,7	7,12
46,9	30,6	99,7	7,13
47,0	30,7	99,7	7,15
47,1	30,6	99,7	7,15
47,2	30,7	99,7	7,17
47,3	30,7	99,7	7,17
47,4	30,8	99,7	7,20
47,5	30,7	99,7	7,21
47,6	30,9	99,7	7,22
47,7	31,1	99,7	7,22
47,8	31,2	99,7	7,23

**EXPÉRIENCE D**

**Tableau 37:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience D :** 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).

Temps (hres)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	2,00E+06	1,20E+03	0,1	
3	3,00E+06	2,00E+04	0,7	
6	4,80E+07	1,14E+06	2,4	
9	9,20E+07	1,60E+06	1,7	
12	9,95E+07	2,30E+06	2,3	
15	1,00E+08	1,14E+07	11,4	
16	1,60E+08	1,40E+08	87,5	
18	2,10E+08	1,90E+08	90,5	
21	2,00E+08	1,75E+08	87,5	
24	1,50E+08	1,00E+08	66,7	9232
25	1,40E+08	1,20E+08	85,7	
27	3,00E+08	2,60E+08	86,7	
30	1,70E+08	1,50E+08	88,2	12021
31	1,30E+08	1,20E+08	92,3	
33	1,65E+08	1,30E+08	78,8	
36	1,40E+08	1,20E+08	85,7	10768
48	2,00E+08	1,60E+08	80,0	11577

**Tableau 38:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience D :** 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	33,9	98,5	6,93
0,1	34,4	96,5	6,94
0,2	34,2	99,7	6,95
0,3	33,3	98,3	6,95
0,4	31,8	94,9	6,98
0,5	30,9	92,6	6,98
0,6	30,0	90,2	6,98
0,7	29,7	89,4	6,98
0,8	29,7	88,9	6,97
0,9	29,4	88,7	6,95
1,0	29,5	88,6	6,94
1,1	29,5	88,5	6,94
1,2	29,9	88,9	6,92
1,2	29,9	89,3	6,89
1,3	30,2	89,6	6,89
1,4	30,6	90,0	6,86
1,5	31,0	90,3	6,84
1,6	31,1	90,8	6,82
1,7	30,8	89,2	6,82
1,8	30,7	89,9	6,80
1,9	30,6	89,9	6,88
2,0	30,6	89,5	6,87
2,1	30,4	89,7	6,86
2,2	30,5	89,5	6,83
2,3	30,7	86,7	6,83
2,4	30,4	86,3	6,82
2,5	30,5	85,8	6,79
2,6	30,6	85,1	6,82
2,7	30,6	84,7	6,80
2,8	30,6	83,8	6,80
2,9	30,4	82,6	6,79
3,0	30,5	81,3	6,86
3,1	30,7	80,0	6,83
3,2	30,4	79,0	6,83
3,3	30,5	77,7	6,82
3,4	30,5	76,8	6,81
3,5	30,3	75,1	6,81
3,6	30,4	69,2	6,88
3,6	30,5	70,7	6,86
3,7	30,6	68,7	6,84
3,8	30,5	66,9	6,83
3,9	30,6	64,6	6,81
4,0	30,6	70,2	6,80
4,1	30,5	67,4	6,82
4,2	30,6	60,8	6,80
4,3	30,7	52,7	6,86
4,4	30,6	46,2	6,82
4,5	30,6	41,2	6,80
4,6	30,6	34,5	6,80
4,7	30,7	22,8	6,80
4,8	30,6	15,8	6,83
4,9	30,6	9,9	6,87
5,0	30,6	4,9	6,91
5,1	30,5	43,1	6,98
5,2	30,8	35,6	7,06
5,3	30,5	31,0	7,11
5,4	30,9	17,0	7,15
5,5	30,6	43,9	7,15
5,6	30,8	42,4	7,21
5,7	30,8	39,9	7,11
5,8	30,6	37,6	7,21
5,9	30,7	53,5	7,21

## ANNEXE-9 (suite)

6,0	30,9	57,9	7,21
6,0	30,7	57,3	7,20
6,1	30,8	57,2	7,15
6,2	30,9	52,4	7,14
6,3	30,7	51,5	7,15
6,4	30,7	53,0	7,12
6,5	30,8	48,7	7,19
6,6	30,8	47,9	7,21
6,7	31,1	41,7	7,22
6,8	30,6	40,1	7,22
6,9	30,8	41,3	7,22
7,0	30,7	36,4	7,20
7,1	30,9	35,8	7,17
7,2	30,7	39,5	7,17
7,3	30,7	30,9	7,17
7,4	31,0	22,0	7,22
7,5	31,0	18,6	7,17
7,6	30,9	24,4	7,15
7,7	30,8	27,0	7,20
7,8	30,9	27,6	7,17
7,9	30,9	29,3	7,21
8,0	30,8	34,3	7,20
8,1	30,7	31,4	7,13
8,2	30,5	10,1	7,16
8,3	30,9	10,1	7,15
8,4	30,8	40,0	7,20
8,4	30,8	34,2	7,17
8,5	30,8	36,8	7,21
8,6	30,6	19,2	7,17
8,7	31,1	38,5	7,20
8,8	30,8	43,9	7,16
8,9	30,8	47,6	7,14
9,0	30,7	50,2	7,21
9,1	30,7	54,7	7,12
9,2	30,7	54,4	7,20
9,3	30,8	59,1	7,12
9,4	30,7	60,8	7,21
9,5	31,1	65,3	7,16
9,6	30,8	67,9	7,20
9,7	30,9	71,0	7,19
9,8	30,7	7,3	7,20
9,9	30,4	2,1	7,18
10,0	30,7	46,4	7,19
10,1	30,4	48,4	7,19
10,2	30,6	51,4	7,17
10,3	30,7	53,1	7,15
10,4	30,6	51,6	7,20
10,5	30,5	57,6	7,17

10,6	30,7	58,6	7,16
10,7	30,6	56,1	7,21
10,8	30,6	61,2	7,17
10,8	30,9	60,2	7,20
10,9	30,5	63,5	7,17
11,0	30,6	56,7	7,21
11,1	30,6	65,8	7,20
11,2	30,4	63,9	7,14
11,3	30,6	66,8	7,17
11,4	30,4	46,5	7,20
11,5	30,7	43,6	7,17
11,6	30,5	59,9	7,18
11,7	30,7	59,3	7,21
11,8	30,5	58,0	7,16
11,9	30,6	59,1	7,17
12,0	30,7	60,2	7,20
12,1	30,6	61,0	7,19
12,2	30,7	61,6	7,20
12,3	30,8	64,7	7,16
12,4	30,6	51,1	6,99
12,5	30,6	56,0	7,06
12,6	30,5	58,2	7,08
12,7	30,5	60,0	7,09
12,8	30,6	61,1	7,11
12,9	30,8	49,9	7,09
13,0	30,6	57,1	7,10
13,1	30,7	57,1	7,12
13,2	30,5	57,3	7,12
13,2	30,4	58,1	7,13
13,3	30,6	57,9	7,13
13,4	30,6	58,8	7,14
13,5	30,5	58,7	7,14
13,6	30,5	59,5	7,15
13,7	30,5	59,2	7,15
13,8	30,4	60,9	7,16
13,9	30,7	58,9	7,15
14,0	30,5	63,4	7,16
14,1	30,7	64,0	7,19
14,2	30,4	64,2	7,18
14,3	30,4	64,8	7,21
14,4	30,6	65,5	7,21
14,5	30,5	65,1	7,21
14,6	30,4	65,1	7,15
14,7	30,4	65,8	7,16
14,8	30,4	70,3	6,03
14,9	30,7	57,6	6,04
15,0	30,6	66,3	6,12
15,1	30,5	65,1	6,18

15,2	30,4	68,0	6,18
15,3	30,5	69,5	6,21
15,4	30,8	71,3	6,17
15,5	30,5	71,9	6,21
15,6	30,5	72,3	6,16
15,6	30,4	72,3	6,18
15,7	30,6	72,8	6,23
15,8	30,6	74,1	6,15
15,9	30,7	69,9	6,16
16,0	30,5	75,5	6,20
16,1	30,4	75,7	6,21
16,2	30,7	76,0	6,03
16,3	30,3	77,0	6,07
16,4	30,6	78,0	6,10
16,5	30,6	78,1	6,10
16,6	30,5	78,8	6,13
16,7	30,7	78,7	6,15
16,8	30,5	79,6	6,17
16,9	30,6	79,7	6,17
17,0	30,7	80,1	6,20
17,1	30,5	80,4	6,21
17,2	30,4	64,7	6,07
17,3	30,5	81,9	6,11
17,4	30,7	82,2	6,14
17,5	30,5	82,8	6,15
17,6	30,6	83,1	6,17
17,7	30,7	83,2	6,18
17,8	30,6	80,9	7,14
17,9	30,5	77,9	7,06
18,0	30,7	80,9	7,03
18,0	30,6	81,4	7,01
18,1	30,6	82,0	7,01
18,2	30,5	82,7	7,01
18,3	30,5	83,2	7,00
18,4	30,6	83,8	7,00
18,5	30,6	84,0	7,00
18,6	30,6	85,2	7,02
18,7	30,4	85,5	7,02
18,8	30,5	86,1	7,03
18,9	30,4	84,2	7,01
19,0	30,5	87,2	7,03
19,1	30,5	87,9	7,04
19,2	30,7	88,1	7,06
19,3	30,4	88,4	7,05
19,4	30,5	88,7	7,06
19,5	30,6	89,3	7,06
19,6	30,4	89,6	7,07
19,7	30,4	89,7	7,07

19,8	30,6	87,5	7,08
19,9	30,7	90,2	7,08
20,0	30,6	90,4	7,09
20,1	30,6	90,5	7,09
20,2	30,5	90,3	7,10
20,3	30,5	90,6	7,12
20,4	30,5	90,6	7,11
20,4	30,4	90,4	7,13
20,5	30,6	90,5	7,14
20,6	30,6	90,8	7,14
20,7	30,3	91,1	7,15
20,8	30,5	85,9	7,14
20,9	30,5	91,7	7,15
21,0	30,5	91,9	7,16
21,1	30,5	92,1	7,17
21,2	30,7	92,3	7,17
21,3	30,7	92,2	7,18
21,4	30,6	92,4	7,20
21,5	30,6	92,8	7,20
21,6	30,5	93,1	7,21
21,7	30,4	92,7	7,12
21,8	30,4	92,4	7,13
21,9	30,5	92,9	7,14
22,0	30,6	93,6	7,15
22,1	30,8	93,9	7,17
22,2	30,5	94,6	7,17
22,3	30,6	94,2	7,17
22,4	30,8	94,5	7,19
22,5	30,5	94,7	7,19
22,6	30,6	94,6	7,20
22,7	30,6	94,8	7,19
22,8	30,4	94,9	7,21
22,8	30,6	86,7	7,19
22,9	30,7	88,1	7,18
23,0	30,7	88,5	7,17
23,1	30,5	89,0	7,17
23,2	30,8	89,5	7,16
23,3	30,7	89,5	7,16
23,4	30,5	89,8	7,15
23,5	30,6	90,1	7,16
23,6	30,6	90,7	7,17
23,7	30,4	83,8	7,16
23,8	30,5	98,5	6,03
23,9	30,8	98,8	6,17
24,0	30,5	98,4	6,18
24,1	30,8	98,5	6,13
24,2	30,5	98,7	6,17
24,3	30,5	99,6	6,21

24,4	30,7	99,8	6,14
24,5	30,5	99,7	6,16
24,6	30,5	99,7	6,18
24,7	30,5	99,7	6,20
24,8	30,7	99,7	6,21
24,9	30,5	92,8	6,17
25,0	30,5	99,7	6,18
25,1	30,5	99,7	6,20
25,2	30,4	99,7	6,13
25,2	30,4	99,7	6,15
25,3	30,5	99,7	6,16
25,4	30,5	99,7	6,17
25,5	30,5	99,7	6,19
25,6	30,4	99,7	6,21
25,7	30,4	99,7	6,20
25,8	30,6	99,7	6,12
25,9	30,6	99,7	6,13
26,0	30,5	96,4	6,13
26,1	30,3	99,7	6,15
26,2	30,5	99,7	6,17
26,3	30,6	99,7	6,17
26,4	30,5	99,7	6,18
26,5	30,5	99,7	6,20
26,6	30,5	99,7	6,22
26,7	30,5	99,7	6,16
26,8	30,4	99,7	6,83
26,9	30,7	98,6	6,79
27,0	30,6	99,7	6,83
27,1	30,5	99,7	6,82
27,2	30,5	99,7	6,82
27,3	30,3	99,7	6,82
27,4	30,6	99,7	6,82
27,5	30,4	99,7	6,82
27,6	30,6	99,7	6,82
27,6	30,5	99,7	6,83
27,7	30,4	99,7	6,82
27,8	30,4	96,7	6,82
27,9	30,4	99,7	6,82
28,0	30,5	99,7	6,83
28,1	30,6	99,7	6,83
28,2	30,5	99,7	6,83
28,3	30,4	99,7	6,83
28,4	30,7	99,7	6,83
28,5	30,7	99,7	6,83
28,6	30,4	99,7	6,84
28,7	30,3	99,7	6,84
28,8	30,5	99,7	6,84
28,9	30,8	99,7	6,84

29,0	30,5	99,7	6,84
29,1	30,7	99,7	6,86
29,2	30,6	99,7	6,86
29,3	30,6	99,7	6,87
29,4	30,3	99,7	6,87
29,5	30,6	99,7	6,87
29,6	30,4	99,7	6,87
29,7	30,5	99,7	6,87
29,8	30,3	99,7	6,87
29,9	30,6	99,7	6,15
30,0	30,6	99,6	6,21
30,0	30,6	99,7	6,18
30,1	30,6	99,8	6,21
30,2	30,5	99,7	6,18
30,3	30,5	99,7	6,21
30,4	30,6	99,7	6,11
30,5	30,8	99,7	6,14
30,6	30,5	99,7	6,15
30,7	30,6	99,7	6,17
30,8	30,5	99,7	6,17
30,9	30,4	99,7	6,18
31,0	30,4	99,7	6,20
31,1	30,6	99,7	6,21
31,2	30,4	99,7	6,15
31,3	30,7	99,7	6,14
31,4	30,6	99,7	6,15
31,5	30,3	99,7	6,16
31,6	30,5	99,7	6,16
31,7	30,5	99,7	6,18
31,8	30,5	99,7	6,17
31,9	30,5	99,7	6,20
32,0	30,5	99,7	6,21
32,1	30,5	99,7	6,21
32,2	30,5	99,7	6,09
32,3	30,3	99,7	6,10
32,4	30,7	99,7	6,11
32,4	30,7	99,7	6,12
32,5	30,4	99,7	6,14
32,6	30,6	99,7	6,14
32,7	30,5	99,7	6,82
32,8	30,9	99,7	6,80
32,9	30,6	99,7	6,89
33,0	30,5	99,7	6,87
33,1	30,2	99,7	6,87
33,2	30,4	99,7	6,87
33,3	30,7	99,7	6,87
33,4	29,9	99,7	6,87
33,5	30,1	99,7	6,87

33,6	30,1	99,7	6,86
33,7	30,4	99,7	6,86
33,8	30,4	99,7	6,86
33,9	30,3	99,7	6,86
34,0	30,3	99,7	6,86
34,1	30,4	99,7	6,87
34,2	30,4	99,7	6,86
34,3	30,4	99,7	6,86
34,4	30,3	99,7	6,86
34,5	30,3	99,8	6,87
34,6	30,3	99,7	6,87
34,7	30,2	99,7	6,87
34,8	30,5	99,7	6,87
34,8	30,5	99,7	6,87
34,9	30,4	99,7	6,88
35,0	30,4	99,7	6,88
35,1	30,6	99,7	6,88
35,2	30,3	99,7	6,88
35,3	30,2	99,7	6,88
35,4	30,4	99,7	6,89
35,5	30,4	99,7	6,88
35,6	30,2	99,7	6,88
35,7	30,2	99,7	6,89
35,8	30,1	99,8	6,17
35,9	30,2	99,7	6,21
36,0	30,3	99,7	6,17
36,1	30,4	99,7	6,20
36,2	30,4	99,7	6,21
36,3	30,2	99,7	6,17
36,4	30,4	99,7	6,18
36,5	30,2	99,7	6,20
36,6	30,3	99,7	6,21
36,7	30,4	99,7	6,16
36,8	30,4	99,7	6,17
36,9	30,2	99,7	6,18
37,0	30,2	99,7	6,20
37,1	30,2	99,7	6,21
37,2	30,2	99,7	6,21
37,2	30,6	99,7	6,10
37,3	30,4	99,8	6,11
37,4	30,1	99,7	6,12
37,5	30,4	99,8	6,13
37,6	30,3	99,8	6,14
37,7	30,1	99,7	6,15
37,8	30,2	99,7	6,15
37,9	30,3	99,7	6,16
38,0	30,4	99,7	6,17
38,1	30,4	99,7	6,18

38,2	30,4	99,7	6,18
38,3	30,2	99,7	6,18
38,4	30,4	99,8	6,20
38,5	30,2	99,7	6,21
38,6	30,4	99,8	6,21
38,7	30,3	99,7	6,15
38,8	30,2	99,7	6,16
38,9	30,4	99,7	6,17
39,0	30,2	99,7	6,17
39,1	30,3	99,7	6,18
39,2	30,3	99,8	6,18
39,3	30,2	99,7	6,18
39,4	30,2	99,8	6,21
39,5	30,3	99,7	6,21
39,6	30,3	99,7	6,21
39,6	30,3	99,8	6,06
39,7	30,2	99,7	6,08
39,8	30,3	99,7	6,10
39,9	30,4	99,7	6,11
40,0	30,4	99,7	6,11
40,1	30,4	99,7	6,12
40,2	30,2	99,8	6,13
40,3	30,3	99,7	6,13
40,4	30,1	99,7	6,13
40,5	30,4	99,8	6,15
40,6	30,2	99,8	6,15
40,7	30,2	99,7	6,16
40,8	30,3	99,7	6,17
40,9	30,3	99,7	6,16
41,0	30,2	99,8	6,17
41,1	30,5	99,7	6,17
41,2	30,4	99,7	6,18
41,3	30,4	99,7	6,18
41,4	30,2	99,7	6,18
41,5	30,4	99,7	6,20
41,6	30,2	99,7	6,20
41,7	30,3	99,7	6,20
41,8	30,1	99,7	6,21
41,9	30,2	99,8	6,07
42,0	30,3	99,7	6,10
42,0	30,3	99,7	6,10
42,1	30,2	99,7	6,11
42,2	30,4	99,8	6,11
42,3	30,4	99,7	6,11
42,4	30,2	99,7	6,12
42,5	30,2	99,7	6,14
42,6	30,5	99,7	6,14
42,7	30,2	99,7	6,15

42,8	30,2	99,7	6,15
42,9	30,2	99,7	6,15
43,0	30,3	99,8	6,16
43,1	30,4	99,7	6,16
43,2	30,2	99,7	6,16
43,3	30,2	99,7	6,17
43,4	30,2	99,7	6,17
43,5	30,2	99,7	6,17
43,6	30,2	99,8	6,18
43,7	30,4	99,7	6,18
43,8	30,3	99,7	6,18
43,9	30,1	99,7	6,20
44,0	30,4	99,7	6,20
44,1	30,2	99,7	6,21
44,2	30,5	99,7	6,21
44,3	30,3	99,7	6,21
44,4	30,4	99,7	6,22
44,4	30,1	99,8	6,16
44,5	30,2	99,7	6,17
44,6	30,4	99,7	6,17
44,7	30,2	99,7	6,17
44,8	30,2	99,7	6,17
44,9	30,2	99,7	6,18
45,0	30,2	99,8	6,18
45,1	30,5	99,7	6,18
45,2	30,3	99,7	6,21
45,3	30,1	99,7	6,20
45,4	30,5	99,7	6,21
45,5	30,4	99,7	6,21
45,6	30,2	99,7	6,08
45,7	30,2	99,7	6,08
45,8	30,1	99,7	6,09
45,9	30,3	99,7	6,10
46,0	30,8	99,7	6,10
46,1	30,2	99,7	6,11
46,2	30,1	99,7	6,11
46,3	30,2	99,7	6,12
46,4	30,4	99,7	6,14
46,5	30,5	99,7	6,13
46,6	30,6	99,7	6,14
46,7	30,5	99,7	6,14
46,8	30,5	99,7	6,15
46,8	30,1	99,7	6,15
46,9	30,3	99,7	6,16
47,0	30,2	99,7	6,16
47,1	30,2	99,7	6,16
47,2	30,4	99,7	6,16
47,3	30,6	99,7	6,17

47,4	30,0	99,7	6,17
47,5	30,4	99,7	6,17
47,6	30,3	99,7	6,17
47,7	30,2	99,7	6,18
47,8	30,1	99,7	6,18

## EXPÉRIENCE E

**Tableau 39:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomototoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience E :** 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).

Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomototoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	2.70E+06	2.00E+03	0,1	
3	4.00E+07	2.70E+03	0,0	
6	4.45E+07	5.90E+05	1,3	
9	1.04E+08	2.24E+06	2,2	
12	2.10E+08	4.00E+06	1,9	
15	1.35E+08	2.05E+07	15,2	
16	1.40E+08	1.25E+08	89,3	
18	2.00E+08	1.45E+08	72,5	
19	2.80E+08	2.45E+08	87,5	
20	3.20E+08	2.50E+08	78,1	
21	2.90E+08	2.60E+08	89,7	
23	3.00E+08	2.50E+08	83,3	
24	4.00E+08	3.80E+08	95,0	10924
25	1.70E+08	1.40E+08	82,4	
27	3.70E+08	3.30E+08	89,2	
28	4.40E+08	3.80E+08	86,4	
30	3.50E+08	2.70E+08	77,1	12833
31	2.75E+08	2.00E+08	72,7	
32	2.40E+08	2.30E+08	95,8	
33	2.80E+08	2.40E+08	85,7	
36	3.60E+08	3.45E+08	95,8	11776
48	2.80E+08	2.30E+08	82,1	10293

**Tableau 40:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience E :** 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	34,2	99,9	7,00
0,1	34,5	99,9	7,01
0,2	34,9	99,9	7,00
0,3	34,0	99,9	7,02
0,4	31,7	99,9	7,03
0,5	32,2	99,9	7,05
0,6	30,7	99,9	7,03
0,7	30,3	99,9	7,03
0,8	30,2	99,9	7,03
0,9	30,5	99,9	7,00

1,0	30,6	99,9	6,99
1,1	30,7	99,8	6,98
1,2	30,8	99,9	6,96
1,2	30,9	99,9	6,95
1,3	30,5	99,8	6,94
1,4	30,7	99,9	6,92
1,5	30,8	99,9	6,91
1,6	31,0	99,9	6,89
1,7	30,9	99,9	6,86
1,8	30,2	99,9	6,86
1,9	30,3	99,9	6,84

2,0	30,2	99,9	6,84
2,1	30,3	99,9	6,83
2,2	30,3	99,9	6,82
2,3	30,2	99,9	6,80
2,4	30,2	99,9	6,81
2,5	30,4	99,9	6,79
2,6	30,2	99,9	6,78
2,7	30,5	99,9	6,92
2,8	30,3	99,9	6,91
2,9	30,3	99,9	6,90
3,0	30,3	99,9	6,88

3,1	30,5	99,9	6,87
3,2	30,6	99,9	6,86
3,3	30,3	99,9	6,86
3,4	30,3	99,9	6,86
3,5	30,2	99,9	6,86
3,6	30,2	99,9	6,84
3,6	30,5	99,9	6,84
3,7	30,2	99,9	6,84
3,8	30,2	99,9	6,86
3,9	30,5	99,9	6,87
4,0	30,2	99,9	6,89

## ANNEXE-10 (suite)

4,1	30,2	99,9	6,91
4,2	30,2	99,9	6,92
4,3	30,7	99,9	6,95
4,4	30,2	99,9	6,98
4,5	30,5	99,9	7,02
4,6	30,4	99,9	7,05
4,7	30,5	99,9	7,09
4,8	30,2	99,9	7,12
4,9	30,3	99,8	7,16
5,0	30,3	99,9	7,20
5,1	30,2	99,9	7,09
5,2	30,4	99,8	7,17
5,3	30,3	99,9	7,15
5,4	30,6	99,9	7,20
5,5	30,3	99,8	7,02
5,6	30,5	99,9	7,12
5,7	30,4	99,8	7,20
5,8	30,7	99,9	7,18
5,9	30,7	99,9	7,08
6,0	30,5	99,9	7,17
6,0	30,5	99,9	7,20
6,1	30,4	99,9	7,20
6,2	30,4	99,9	7,20
6,3	30,3	99,9	7,21
6,4	30,4	99,8	7,20
6,5	30,3	99,7	7,19
6,6	30,5	99,4	7,17
6,7	30,3	98,0	7,15
6,8	30,3	97,3	7,17
6,9	30,3	97,4	7,18
7,0	30,4	96,8	7,12
7,1	30,3	97,1	7,16
7,2	30,5	97,1	7,19
7,3	30,4	97,6	7,13
7,4	30,3	97,7	7,20
7,5	30,4	97,8	7,20
7,6	30,5	97,9	7,18
7,7	30,5	98,0	7,21
7,8	30,5	98,2	7,07
7,9	30,5	98,3	7,21
8,0	30,5	98,4	7,12
8,1	30,4	98,2	7,20
8,2	30,4	98,2	7,16
8,3	30,4	99,9	7,05
8,4	30,4	99,9	7,21
8,4	30,5	99,9	7,04
8,5	30,3	99,9	7,15
8,6	30,4	99,9	7,17

8,7	30,5	99,9	7,22
8,8	30,5	99,9	7,12
8,9	30,6	99,9	7,18
9,0	30,4	99,9	7,14
9,1	30,5	99,9	7,15
9,2	30,7	99,9	7,17
9,3	30,5	99,9	7,20
9,4	30,6	99,9	7,12
9,5	30,7	99,9	7,17
9,6	30,3	99,9	7,21
9,7	30,4	99,9	7,03
9,8	30,4	99,9	7,17
9,9	30,3	99,9	7,20
10,0	30,6	99,9	7,17
10,1	30,3	99,9	7,20
10,2	30,4	99,9	7,18
10,3	30,5	99,9	7,19
10,4	30,3	99,8	7,20
10,5	30,5	99,9	7,22
10,6	30,4	99,9	7,17
10,7	30,5	99,9	7,12
10,8	30,6	99,9	7,14
10,8	30,6	99,9	7,17
10,9	30,6	99,9	7,12
11,0	30,5	99,9	7,11
11,1	30,3	99,9	7,21
11,2	30,5	99,9	7,06
11,3	30,4	99,9	7,18
11,4	30,6	99,9	7,19
11,5	30,5	99,9	7,12
11,6	30,6	99,9	7,18
11,7	30,6	99,9	7,14
11,8	30,4	99,9	7,20
11,9	30,5	99,8	7,18
12,0	30,6	99,9	7,21
12,1	30,5	99,9	7,21
12,2	30,6	99,9	7,21
12,3	30,4	99,9	7,19
12,4	30,3	99,9	7,00
12,5	30,3	99,9	7,14
12,6	30,3	99,9	7,19
12,7	30,5	99,9	7,15
12,8	30,3	99,9	7,20
12,9	30,4	99,8	7,14
13,0	30,6	99,9	7,16
13,1	30,5	99,9	7,20
13,2	30,5	99,9	7,12
13,2	30,3	99,9	7,19

13,3	30,4	99,9	7,17
13,4	30,4	99,9	7,14
13,5	30,5	99,9	7,20
13,6	30,6	99,9	7,15
13,7	30,5	99,9	7,21
13,8	30,5	99,9	7,09
13,9	30,3	99,9	7,20
14,0	30,4	99,9	7,11
14,1	30,5	99,9	7,19
14,2	30,5	99,9	7,17
14,3	30,5	99,9	7,11
14,4	30,6	99,9	7,20
14,5	30,4	99,9	7,12
14,6	30,3	99,9	7,17
14,7	30,5	99,9	7,14
14,8	30,4	99,9	6,05
14,9	30,5	99,9	6,12
15,0	30,4	99,9	6,03
15,1	30,4	99,9	5,97
15,2	30,3	99,9	6,23
15,3	30,5	99,9	6,20
15,4	30,3	99,9	6,08
15,5	30,5	99,8	6,04
15,6	30,3	99,9	6,20
15,6	30,3	99,9	6,11
15,7	30,9	99,9	6,07
15,8	31,0	99,9	6,96
15,9	30,9	99,9	6,91
16,0	30,7	99,9	6,89
16,1	30,6	99,9	6,89
16,2	30,7	99,9	6,91
16,3	30,7	99,9	6,91
16,4	30,6	99,9	6,92
16,5	30,7	99,9	6,94
16,6	30,8	99,9	6,96
16,7	30,6	99,9	6,96
16,8	30,7	99,9	6,99
16,9	30,6	99,9	7,00
17,0	30,6	99,9	7,02
17,1	30,9	99,9	7,00
17,2	30,7	99,9	7,00
17,3	30,5	99,9	7,03
17,4	30,6	99,9	7,05
17,5	30,6	99,9	7,07
17,6	30,6	99,9	7,08
17,7	30,8	99,9	7,08
17,8	30,8	99,9	7,05
17,9	30,6	99,9	7,08

18,0	30,7	99,9	7,09
18,0	30,6	99,9	7,11
18,1	30,6	99,9	7,11
18,2	30,9	99,9	7,13
18,3	30,5	99,9	7,13
18,4	30,6	99,9	7,15
18,5	30,7	99,9	7,15
18,6	30,5	99,9	7,16
18,7	30,6	99,9	7,15
18,8	30,7	99,9	6,07
18,9	30,6	99,9	6,01
19,0	30,6	99,9	6,04
19,1	30,6	99,9	6,11
19,2	30,5	99,9	6,05
19,3	30,7	99,9	5,96
19,4	30,6	99,9	6,06
19,5	30,7	99,9	5,95
19,6	30,6	99,9	6,06
19,7	30,5	99,9	6,11
19,8	30,6	99,9	6,02
19,9	30,7	99,9	6,86
20,0	30,5	99,9	6,82
20,1	30,6	99,9	6,78
20,2	30,6	99,9	6,80
20,3	30,7	99,9	6,80
20,4	30,5	99,8	6,80
20,4	30,5	99,9	6,81
20,5	30,5	99,9	6,83
20,6	30,7	99,9	6,83
20,7	30,4	99,9	6,96
20,8	30,6	99,9	6,93
20,9	30,6	99,9	6,94
21,0	30,6	99,9	6,95
21,1	30,6	99,9	6,96
21,2	30,6	99,9	6,96
21,3	30,5	99,8	6,99
21,4	30,5	99,9	6,99
21,5	30,6	99,8	7,00
21,6	30,5	99,9	7,01
21,7	30,6	99,9	7,02
21,8	30,7	99,9	7,03
21,9	30,4	99,9	7,04
22,0	30,6	99,9	7,05
22,1	30,7	99,9	7,06
22,2	30,7	99,9	7,06
22,3	30,4	99,9	7,07
22,4	30,4	99,9	7,09
22,5	30,4	99,9	7,10

22,6	30,5	99,9	7,10
22,7	30,3	99,9	7,11
22,8	30,2	99,9	7,10
22,8	30,4	99,9	6,23
22,9	30,5	99,8	5,95
23,0	30,5	99,9	6,03
23,1	30,3	99,9	6,07
23,2	30,3	99,9	6,12
23,3	30,3	99,9	6,16
23,4	30,5	99,8	6,21
23,5	30,3	99,9	6,16
23,6	30,3	99,9	6,21
23,7	30,5	99,9	6,08
23,8	30,6	99,9	6,10
23,9	30,6	99,9	7,08
24,0	30,4	99,8	7,01
24,1	30,6	99,8	6,98
24,2	30,5	99,8	6,94
24,3	30,3	99,9	6,94
24,4	30,5	99,9	6,93
24,5	30,5	99,8	6,92
24,6	30,3	99,9	6,94
24,7	30,5	99,9	6,94
24,8	30,5	99,9	6,95
24,9	30,3	99,9	6,98
25,0	30,5	99,8	7,02
25,1	30,3	99,9	7,06
25,2	30,4	99,9	7,08
25,2	30,4	99,8	7,09
25,3	30,4	99,9	7,11
25,4	30,4	99,9	7,11
25,5	30,5	99,9	7,12
25,6	30,2	99,9	7,14
25,7	30,5	99,9	7,14
25,8	30,1	99,9	7,15
25,9	30,2	99,9	7,16
26,0	30,2	99,9	7,15
26,1	30,2	99,9	7,17
26,2	30,2	99,8	7,16
26,3	30,5	99,9	7,17
26,4	30,3	99,9	7,18
26,5	30,5	99,9	7,17
26,6	30,3	99,9	7,18
26,7	30,3	99,9	7,19
26,8	30,7	99,9	6,13
26,9	30,3	99,9	6,05
27,0	30,5	99,9	6,14
27,1	30,3	99,9	6,18

27,2	30,2	99,9	6,21
27,3	30,3	99,9	6,14
27,4	30,2	99,9	6,18
27,5	30,3	99,9	6,21
27,6	30,2	99,9	6,19
27,6	30,5	99,9	6,09
27,7	30,6	99,9	7,06
27,8	30,3	99,9	7,01
27,9	30,5	99,9	6,98
28,0	30,3	99,8	6,98
28,1	30,2	99,9	6,98
28,2	30,5	99,8	6,97
28,3	30,4	99,9	6,96
28,4	30,3	99,9	6,98
28,5	30,3	99,9	6,99
28,6	30,2	99,9	6,98
28,7	30,2	99,9	7,00
28,8	30,9	99,9	6,99
28,9	30,6	99,9	7,00
29,0	30,7	99,9	7,00
29,1	30,6	99,9	7,01
29,2	30,6	99,9	7,01
29,3	30,6	99,8	7,03
29,4	30,6	99,9	7,02
29,5	30,6	99,9	7,03
29,6	30,3	99,9	7,04
29,7	30,6	99,9	7,03
29,8	30,5	99,9	7,05
29,9	30,4	99,9	7,03
30,0	30,5	99,9	7,04
30,0	30,6	99,9	7,06
30,1	30,6	99,9	7,06
30,2	30,5	99,9	7,07
30,3	30,6	99,9	7,09
30,4	30,7	99,9	7,09
30,5	30,7	99,9	7,09
30,6	30,6	99,9	7,09
30,7	30,6	99,9	7,11
30,8	30,5	99,9	6,09
30,9	30,5	99,9	6,16
31,0	30,6	99,9	6,22
31,1	30,5	99,9	6,07
31,2	30,6	99,9	6,12
31,3	30,5	99,9	6,14
31,4	30,4	99,9	6,17
31,5	30,6	99,9	6,20
31,6	30,6	99,9	6,21
31,7	30,3	99,8	6,09

31,8	30,5	99,9	7,14
31,9	30,6	99,8	7,07
32,0	30,4	99,8	7,03
32,1	30,5	99,9	7,03
32,2	30,6	99,9	7,01
32,3	30,5	99,9	7,01
32,4	30,5	99,9	7,02
32,4	30,5	99,9	7,02
32,5	30,4	99,9	7,02
32,6	30,6	99,9	7,02
32,7	30,5	99,9	7,03
32,8	30,6	99,9	7,03
32,9	30,5	99,9	7,03
33,0	30,6	99,9	7,04
33,1	30,5	99,9	7,03
33,2	30,5	99,9	7,03
33,3	30,6	99,9	7,05
33,4	30,6	99,9	7,04
33,5	30,7	99,9	7,06
33,6	30,4	99,9	7,05
33,7	30,6	99,9	7,05
33,8	30,5	99,9	7,06
33,9	30,6	99,9	7,06
34,0	30,5	99,9	7,06
34,1	30,5	99,9	7,08
34,2	30,5	99,9	7,07
34,3	30,5	99,9	7,09
34,4	30,5	99,9	7,08
34,5	30,5	99,8	7,08
34,6	30,5	99,9	7,09
34,7	30,6	99,9	7,09
34,8	30,5	99,9	7,09
34,8	30,5	99,9	7,09
34,9	30,5	99,9	7,10
35,0	30,6	99,9	7,10
35,1	30,5	99,9	7,10
35,2	30,5	99,9	7,10
35,3	30,5	99,9	7,10
35,4	30,5	99,9	7,13
35,5	30,7	99,9	7,11
35,6	30,6	99,9	7,12
35,7	30,6	99,9	7,11
35,8	30,5	99,9	6,16
35,9	30,6	99,9	6,16
36,0	30,7	99,9	6,19
36,1	30,6	99,9	6,01
36,2	30,7	99,9	6,06
36,3	30,5	99,9	6,07

36,4	30,5	99,9	6,11
36,5	30,4	99,9	6,12
36,6	30,6	99,9	6,14
36,7	30,5	99,9	6,15
36,8	30,6	99,9	6,16
36,9	30,5	99,9	6,18
37,0	30,5	99,9	6,20
37,1	30,6	99,9	6,21
37,2	30,4	99,9	6,21
37,2	30,5	99,9	6,11
37,3	30,7	99,9	6,13
37,4	30,5	99,9	6,15
37,5	30,6	99,9	6,15
37,6	30,5	99,9	6,16
37,7	30,6	99,9	6,17
37,8	30,5	99,9	6,18
37,9	30,5	99,9	6,20
38,0	30,4	99,9	6,21
38,1	30,6	99,9	6,10
38,2	30,5	99,9	6,11
38,3	30,5	99,9	6,12
38,4	30,6	99,9	6,12
38,5	30,3	99,9	6,14
38,6	30,5	99,9	6,16
38,7	30,5	99,9	6,17
38,8	30,5	99,9	6,17
38,9	30,5	99,9	6,18
39,0	30,4	99,9	6,18
39,1	30,5	99,9	6,19
39,2	30,5	99,9	6,20
39,3	30,4	99,9	6,18
39,4	30,6	99,9	6,18
39,5	30,5	99,9	6,20
39,6	30,6	99,9	6,21
39,6	30,6	99,9	6,21
39,7	30,6	99,9	6,12
39,8	30,6	99,9	6,14
39,9	30,5	99,9	6,15
40,0	30,4	99,9	6,16
40,1	30,6	99,9	6,17
40,2	30,4	99,9	6,18
40,3	30,6	99,9	6,19
40,4	30,6	99,9	6,18
40,5	30,5	99,9	6,20
40,6	30,5	99,9	6,21
40,7	30,5	99,9	6,19
40,8	30,5	99,9	6,20
40,9	30,6	99,9	6,21

41,0	30,6	99,8	6,12
41,1	30,6	99,9	6,14
41,2	30,5	99,9	6,14
41,3	30,5	99,9	6,16
41,4	30,5	99,9	6,15
41,5	30,5	99,9	6,17
41,6	30,5	99,9	6,17
41,7	30,5	99,9	6,18
41,8	30,5	99,9	6,18
41,9	30,6	99,9	6,19
42,0	30,6	99,9	6,20
42,0	30,7	99,9	6,19
42,1	30,3	99,9	6,21
42,2	30,5	99,9	6,20
42,3	30,5	99,9	6,20
42,4	30,3	99,9	6,21
42,5	30,6	99,9	6,18
42,6	30,6	99,9	6,20
42,7	30,5	99,9	6,21
42,8	30,4	99,9	6,21
42,9	30,5	99,9	6,05
43,0	30,5	99,9	6,06
43,1	30,4	99,9	6,08
43,2	30,5	99,9	6,08
43,3	30,5	99,9	6,10
43,4	30,4	99,9	6,11
43,5	30,5	99,9	6,11
43,6	30,5	99,9	6,12
43,7	30,5	99,9	6,13
43,8	30,5	99,9	6,14
43,9	30,5	99,9	6,14
44,0	30,5	99,9	6,15
44,1	30,5	99,9	6,16
44,2	30,5	99,9	6,18
44,3	30,6	99,9	6,17
44,4	30,6	99,9	6,17
44,4	30,6	99,9	6,18
44,5	30,6	99,9	6,18
44,6	30,6	99,9	6,20
44,7	30,5	99,9	6,20
44,8	30,5	99,9	6,21
44,9	30,7	99,9	6,21
45,0	30,4	99,9	6,05
45,1	30,5	99,9	6,07
45,2	30,3	99,9	6,08
45,3	30,6	99,9	6,09
45,4	30,3	99,9	6,10
45,5	30,5	99,9	6,11

45,6	30,5	99,9	6,11
45,7	30,3	99,9	6,12
45,8	30,4	99,9	6,12
45,9	30,4	99,9	6,12
46,0	30,5	99,9	6,14
46,1	30,4	99,9	6,14
46,2	30,5	99,9	6,14
46,3	30,4	99,9	6,15
46,4	30,6	99,9	6,14
46,5	30,6	99,9	6,16
46,6	30,5	99,8	6,17
46,7	30,4	99,9	6,17
46,8	30,5	99,9	6,18
46,8	30,6	99,9	6,18
46,9	30,6	99,9	6,18
47,0	30,5	99,9	6,18
47,1	30,4	99,9	6,20
47,2	30,5	99,9	6,21
47,3	30,4	99,9	6,20
47,4	30,2	99,9	6,21
47,5	30,2	99,9	6,13
47,6	30,3	99,9	6,14
47,7	30,2	99,9	6,14
47,8	30,2	99,9	6,15

EXPÉRIENCES D ET E : CO<sub>2</sub>

**Tableau 41:** Données brutes pour le suivi du CO<sub>2</sub> durant la fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience D :** 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). **Expérience E :** 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h).

Temps (h)	Expérience	
	D	E
0	0	0
0,25	0	0
2	0	0
3,5	0,15	0,09
7,25	0,92	0,97
8,75	0,75	0,98
10	0,57	0,86
11,5	0,41	0,68
13	0,32	0,8
14	0,34	0,79
15	0,58	2,05
16	0,32	0,25
17	0,28	0,39
18	0,1	0,36
19	0,18	0,38
20	0,16	0,32
21	0,15	0,19
23	0,12	0,16
24	0,22	0,16
25	0,11	0,38
26	0,09	0,12
27	0,07	0,58
27,5	0,09	0,13
28	0,1	0,08
29	0,1	0,11
30	0,18	0,11
31	0,1	0,45
31,45	0,07	0,11
32	0,09	0,05
33	0,05	0,11
36	0,09	0,09
48	0,09	0,05

## EXPÉRIENCE F

**Tableau 42:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience F :** 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h).

Temps (h)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / $\mu$ l
	totaux	spores		
0	6,30E+06	3,10E+03	0,0	
3	1,10E+07	6,90E+03	0,1	
6	2,40E+07	2,05E+06	8,5	
9	1,10E+08	1,84E+06	1,7	
12	1,50E+08	3,70E+06	2,5	
15	2,10E+08	4,00E+06	1,9	
16	3,70E+08	3,00E+07	8,1	
18	4,50E+08	1,85E+08	41,1	
19	4,20E+08	2,20E+08	52,4	
21	4,40E+08	2,10E+08	47,7	
24	4,50E+08	3,60E+08	80,0	11241
27	4,70E+08	3,50E+08	74,5	
30	6,90E+08	6,70E+08	97,1	11492
31	6,80E+08	5,30E+08	77,9	
33	4,80E+08	4,20E+08	87,5	
36	7,45E+08	6,20E+08	83,2	12675
48	7,30E+08	6,60E+08	90,4	13137

**Tableau 43:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience F :** 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	28,8	92,4	6,94
0,1	28,6	92,5	6,93
0,2	28,7	92,6	6,91
0,3	28,7	92,5	6,91
0,4	28,6	92,7	6,89
0,5	28,4	93,1	6,90
0,6	28,7	93,7	6,91
0,7	28,7	93,7	6,92
0,8	28,7	93,3	6,91
0,9	28,6	93,2	6,92
1,0	28,6	93,1	6,89
1,1	28,5	93,2	6,89
1,2	28,5	93,2	6,88
1,2	28,7	93,2	6,85
1,3	28,8	93,0	6,87
1,4	28,6	92,9	6,86
1,5	28,6	92,7	6,84
1,6	28,6	92,5	6,82
1,7	28,9	92,4	6,82
1,8	28,6	92,2	6,80
1,9	28,6	92,2	6,80
2,0	28,6	92,1	6,91
2,1	28,6	92,1	6,91
2,2	28,6	92,0	6,88
2,3	28,7	91,1	6,84
2,4	28,5	91,7	6,82
2,5	28,8	91,7	6,82
2,6	28,9	91,5	6,80
2,7	28,9	91,3	6,84
2,8	28,6	91,1	6,82
2,9	28,6	91,0	6,80
3,0	28,6	90,9	6,88
3,1	28,9	91,1	6,86
3,2	28,5	90,9	6,83
3,3	28,9	90,8	6,80
3,4	28,6	90,5	6,84
3,5	29,0	90,4	6,83
3,6	28,9	90,0	6,80
3,6	28,6	89,7	6,87
3,7	28,9	89,6	6,84
3,8	28,7	89,2	6,81
3,9	28,8	88,8	6,81
4,0	28,6	89,1	6,84
4,1	28,9	88,7	6,86
4,2	28,4	88,0	6,81
4,3	28,9	87,6	6,81
4,4	28,4	87,1	6,78
4,5	28,9	86,6	6,86
4,6	28,7	86,7	6,84
4,7	29,0	85,9	6,82
4,8	28,8	85,0	6,82
4,9	29,0	83,8	6,82
5,0	28,8	83,2	6,81
5,1	29,1	84,6	6,81
5,2	28,8	84,0	6,80
5,3	28,8	82,6	6,83
5,4	29,0	80,4	6,83
5,5	28,9	81,9	6,86
5,6	28,8	80,5	6,91
5,7	29,0	80,9	6,94
5,8	28,6	81,0	6,96
5,9	28,8	81,4	6,99
6,0	28,9	81,8	7,05

6,0	28,9	82,1	7,08
6,1	28,8	88,5	7,12
6,2	28,7	88,8	7,15
6,3	28,8	83,9	7,20
6,4	28,8	84,1	7,22
6,5	29,0	84,4	7,15
6,6	28,9	84,6	7,21
6,7	28,7	85,2	7,20
6,8	29,0	86,3	7,20
6,9	28,8	86,6	7,16
7,0	28,9	85,6	7,13
7,1	29,1	85,3	7,20
7,2	28,9	85,2	7,20
7,3	28,7	85,2	7,18
7,4	28,9	85,2	7,17
7,5	29,1	85,2	7,19
7,6	28,9	85,2	7,22
7,7	28,8	85,2	7,20
7,8	29,0	85,0	7,14
7,9	29,1	85,1	7,20
8,0	28,8	85,2	7,17
8,1	30,9	85,2	7,17
8,2	28,9	85,2	7,17
8,3	29,0	85,1	7,15
8,4	28,8	85,0	7,00
8,4	29,4	93,5	7,06
8,5	28,7	84,7	7,14
8,6	28,8	85,0	7,20
8,7	28,8	84,6	7,19
8,8	29,0	85,9	7,16
8,9	29,1	85,0	7,12
9,0	29,0	84,9	7,21
9,1	28,8	84,7	7,20
9,2	29,0	87,4	7,18
9,3	29,1	84,7	7,17
9,4	29,0	84,6	7,15
9,5	28,8	84,6	7,12
9,6	28,7	84,4	7,21
9,7	28,9	84,3	7,20
9,8	28,9	84,1	7,19
9,9	28,9	83,9	7,21
10,0	28,8	83,9	7,20
10,1	28,8	83,8	7,15
10,2	28,9	83,6	7,16
10,3	28,9	83,8	7,15
10,4	28,9	83,7	7,21
10,5	28,9	83,7	7,20

10,6	29,0	83,6	7,18
10,7	28,7	83,6	7,20
10,8	28,9	83,5	7,19
10,8	29,1	83,4	7,20
10,9	28,9	83,2	7,12
11,0	28,8	83,2	7,16
11,1	29,1	83,1	7,14
11,2	28,7	83,0	7,17
11,3	28,7	82,9	7,13
11,4	28,7	82,9	7,17
11,5	28,6	83,1	7,20
11,6	28,7	83,4	7,19
11,7	28,9	83,6	7,01
11,8	28,9	83,8	7,15
11,9	29,0	85,4	7,19
12,0	28,8	85,1	7,16
12,1	28,9	85,2	7,16
12,2	28,9	85,8	7,22
12,3	29,0	85,9	7,19
12,4	29,0	86,1	7,20
12,5	28,9	86,4	7,17
12,6	29,0	86,6	7,15
12,7	28,8	86,5	7,22
12,8	29,0	86,9	7,16
12,9	29,0	86,8	7,14
13,0	29,0	87,1	7,20
13,1	28,9	87,4	7,20
13,2	28,9	88,6	7,16
13,2	28,7	88,6	7,20
13,3	28,8	88,7	7,09
13,4	28,8	88,4	7,16
13,5	29,0	87,1	7,20
13,6	29,0	87,5	7,19
13,7	28,7	87,7	7,20
13,8	28,7	87,7	7,16
13,9	28,8	87,8	7,22
14,0	28,8	87,9	7,19
14,1	28,7	88,0	7,15
14,2	28,8	88,5	7,21
14,3	28,9	90,0	7,17
14,4	28,6	87,5	7,21
14,5	29,0	87,6	7,16
14,6	28,7	87,8	7,21
14,7	29,3	88,0	7,92
14,8	29,0	89,0	7,83
14,9	29,0	89,1	7,73
15,0	29,0	89,2	7,77

15,1	28,7	89,6	7,71
15,2	28,7	89,7	7,69
15,3	28,7	89,8	7,72
15,4	28,7	90,4	7,94
15,5	29,1	90,5	7,88
15,6	28,6	90,9	7,81
15,6	28,9	90,8	7,85
15,7	28,9	91,5	7,79
15,8	29,1	91,3	7,83
15,9	28,9	91,2	7,79
16,0	28,8	91,4	7,79
16,1	28,9	91,7	7,82
16,2	29,1	91,7	7,78
16,3	29,2	91,8	7,83
16,4	28,8	91,7	7,82
16,5	28,9	92,0	7,79
16,6	28,8	91,8	7,80
16,7	28,9	91,7	7,96
16,8	28,7	92,0	7,92
16,9	28,9	91,5	7,88
17,0	28,8	91,2	7,87
17,1	28,8	91,1	7,85
17,2	28,7	91,7	7,83
17,3	28,8	91,0	7,81
17,4	28,7	91,2	7,81
17,5	28,7	90,8	7,77
17,6	28,7	91,2	7,86
17,7	28,9	91,0	7,84
17,8	28,7	92,3	7,85
17,9	29,1	91,5	6,14
18,0	28,7	90,2	6,12
18,0	28,6	93,6	6,16
18,1	29,0	90,6	6,11
18,2	28,7	90,5	6,17
18,3	28,9	90,1	6,21
18,4	28,8	90,1	6,12
18,5	28,9	90,1	6,14
18,6	28,9	89,9	6,17
18,7	28,8	89,7	6,20
18,8	29,1	89,8	6,12
18,9	28,7	89,7	6,15
19,0	28,7	89,5	6,17
19,1	28,8	89,4	6,20
19,2	28,9	89,6	6,03
19,3	28,7	89,4	6,07
19,4	28,9	89,9	6,09
19,5	28,7	89,6	6,12

19,6	28,8	89,8	6,14
19,7	28,8	89,8	6,16
19,8	28,8	89,8	6,17
19,9	28,9	89,8	6,18
20,0	28,7	89,9	6,20
20,1	28,8	89,8	6,09
20,2	28,9	89,7	6,12
20,3	28,7	89,5	6,13
20,4	28,9	89,5	6,16
20,4	28,6	89,5	6,17
20,5	29,0	89,5	6,21
20,6	28,7	89,5	6,14
20,7	28,5	89,5	6,17
20,8	28,7	89,8	6,21
20,9	28,9	89,5	6,21
21,0	28,6	89,2	6,12
21,1	28,9	88,9	6,15
21,2	28,8	88,7	6,18
21,3	28,6	88,8	6,19
21,4	29,0	88,8	6,03
21,5	28,7	88,8	6,08
21,6	28,8	88,9	6,10
21,7	29,0	88,9	6,12
21,8	28,5	89,2	6,16
21,9	28,7	89,3	6,18
22,0	29,0	89,3	6,21
22,1	28,7	89,2	6,08
22,2	28,9	89,1	6,12
22,3	28,6	89,3	6,14
22,4	28,5	89,2	6,17
22,5	28,5	89,3	6,19
22,6	28,7	89,3	6,05
22,7	28,6	89,2	6,09
22,8	28,5	89,3	6,11
22,8	28,8	89,1	6,14
22,9	28,7	88,8	6,17
23,0	28,7	88,8	6,20
23,1	28,9	88,8	6,05
23,2	28,6	88,7	6,10
23,3	28,8	88,6	6,13
23,4	28,7	88,4	6,17
23,5	28,7	88,4	6,18
23,6	28,9	88,5	6,03
23,7	28,9	88,3	7,01
23,8	28,4	88,7	6,95
23,9	28,9	88,9	6,94
24,0	28,6	89,2	6,94

## ANNEXE-12 (suite)

24,1	28,5	89,5	6,94
24,2	28,7	89,8	6,94
24,3	28,6	89,9	6,96
24,4	28,9	89,7	6,96
24,5	28,5	89,7	6,98
24,6	28,9	90,2	6,98
24,7	29,1	90,1	7,00
24,8	28,7	90,6	6,99
24,9	28,7	90,1	7,02
25,0	28,7	90,1	7,02
25,1	28,7	90,0	7,04
25,2	28,9	90,1	7,06
25,2	28,5	90,2	7,06
25,3	28,6	90,3	7,07
25,4	28,9	90,1	7,07
25,5	28,5	90,3	7,09
25,6	28,9	90,3	7,10
25,7	28,6	90,4	7,11
25,8	28,6	90,4	7,11
25,9	28,7	90,4	7,11
26,0	28,7	90,3	7,14
26,1	28,4	90,1	7,12
26,2	28,9	90,1	7,12
26,3	28,8	90,0	7,12
26,4	28,9	90,0	7,13
26,5	28,5	89,9	7,14
26,6	28,7	90,1	7,14
26,7	28,9	90,1	7,14
26,8	29,0	90,2	7,15
26,9	28,6	90,3	7,14
27,0	28,7	90,3	7,14
27,1	28,7	90,9	7,15
27,2	28,6	90,6	7,15
27,3	28,9	90,5	7,14
27,4	28,5	90,2	7,14
27,5	28,5	90,3	7,15
27,6	28,7	90,0	7,15
27,6	28,5	89,8	7,14
27,7	28,5	89,8	7,15
27,8	28,5	89,8	7,13
27,9	28,6	89,9	7,12
28,0	28,6	89,6	7,14
28,1	28,6	89,5	7,12
28,2	28,7	89,4	7,11
28,3	28,7	89,5	7,11
28,4	29,0	89,3	7,10
28,5	28,4	89,2	7,11

28,6	28,6	89,2	7,11
28,7	29,0	89,2	7,09
28,8	28,5	88,8	7,09
28,9	28,8	88,8	7,08
29,0	28,9	88,8	7,07
29,1	28,7	88,7	7,07
29,2	28,5	88,9	7,06
29,3	28,6	88,9	7,06
29,4	28,7	88,8	7,04
29,5	28,6	88,7	7,03
29,6	29,3	88,8	7,03
29,7	28,9	87,8	8,03
29,8	28,9	87,7	7,93
29,9	28,6	89,2	7,85
30,0	28,8	89,5	7,89
30,0	28,9	89,3	7,85
30,1	28,7	89,3	7,79
30,2	29,0	89,2	7,82
30,3	28,5	89,2	7,82
30,4	29,0	88,8	7,85
30,5	28,7	89,5	7,79
30,6	28,4	89,3	7,79
30,7	29,1	88,9	8,00
30,8	29,0	86,8	8,04
30,9	28,9	86,8	7,96
31,0	28,6	93,3	7,85
31,1	28,8	87,9	7,82
31,2	29,0	89,2	7,80
31,3	28,5	89,5	7,90
31,4	29,0	90,3	7,85
31,5	28,7	91,7	7,79
31,6	28,5	90,3	7,83
31,7	28,9	89,5	7,79
31,8	28,7	89,0	7,83
31,9	28,8	89,3	7,83
32,0	28,8	89,1	7,78
32,1	28,8	89,1	7,82
32,2	28,7	89,1	7,79
32,3	28,8	88,9	7,80
32,4	28,8	89,0	7,82
32,4	28,7	89,1	7,78
32,5	29,0	92,5	7,78
32,6	28,6	89,2	7,82
32,7	29,0	95,2	6,15
32,8	29,0	97,0	6,16
32,9	28,9	97,3	6,19
33,0	28,7	98,0	6,10

33,1	28,6	97,7	6,11
33,2	28,9	99,8	6,12
33,3	28,8	99,8	6,12
33,4	28,7	99,8	6,12
33,5	28,7	99,8	6,12
33,6	28,7	99,8	6,12
33,7	29,0	99,8	6,12
33,8	29,0	99,8	6,12
33,9	29,0	99,8	6,13
34,0	28,9	99,8	6,12
34,1	28,7	99,8	6,12
34,2	28,7	99,8	6,13
34,3	28,7	99,8	6,11
34,4	28,8	99,8	6,11
34,5	28,7	99,8	6,10
34,6	28,6	99,8	6,10
34,7	28,7	99,8	6,10
34,8	28,9	99,8	6,10
34,8	28,8	99,8	6,10
34,9	29,0	99,8	6,10
35,0	28,7	99,8	6,08
35,1	28,6	99,8	6,10
35,2	28,8	99,8	6,09
35,3	28,6	99,8	6,09
35,4	28,8	99,8	6,08
35,5	28,6	99,8	6,08
35,6	28,7	99,8	6,07
35,7	28,7	99,8	6,06
35,8	28,6	99,8	6,06
35,9	28,6	99,8	6,06
36,0	28,8	99,8	6,06
36,1	28,7	99,8	6,06
36,2	28,9	99,8	6,03
36,3	29,0	99,8	6,03
36,4	28,6	99,8	6,04
36,5	28,9	99,8	6,04
36,6	28,7	99,8	6,03
36,7	28,8	99,8	6,02
36,8	28,9	99,8	6,03
36,9	28,7	99,8	6,02
37,0	28,6	99,8	6,03
37,1	28,7	99,8	6,01
37,2	28,8	99,8	6,01
37,2	29,0	99,8	6,01
37,3	28,6	99,8	6,00
37,4	28,7	99,8	6,00
37,5	28,8	99,8	6,00

37,6	28,8	99,8	6,00
37,7	28,8	99,8	6,00
37,8	28,7	99,8	5,97
37,9	28,6	99,8	5,99
38,0	28,7	99,8	6,00
38,1	28,8	99,8	5,98
38,2	28,6	99,8	5,97
38,3	28,7	99,8	5,98
38,4	28,7	99,8	5,98
38,5	28,6	99,8	5,96
38,6	28,7	99,8	5,98
38,7	28,8	99,8	5,98
38,8	28,6	99,8	5,97
38,9	28,6	99,8	5,97
39,0	28,5	99,8	5,96
39,1	28,7	99,8	5,96
39,2	28,7	99,8	5,97
39,3	28,8	99,8	5,97
39,4	28,8	99,8	5,97
39,5	28,9	99,8	5,98
39,6	28,8	99,8	5,96
39,6	28,9	99,8	5,96
39,7	28,6	99,8	5,97
39,8	28,8	99,8	5,96
39,9	28,9	99,8	5,95
40,0	28,7	99,8	5,96
40,1	28,6	99,8	5,97
40,2	28,9	99,8	5,96
40,3	28,8	99,8	5,97
40,4	28,6	99,8	5,96
40,5	28,9	99,8	5,95
40,6	28,8	99,8	5,94
40,7	28,8	99,8	5,95
40,8	28,5	99,8	5,94
40,9	28,9	99,8	5,95
41,0	28,7	99,8	5,95
41,1	28,7	99,8	5,96
41,2	28,9	99,8	5,94
41,3	28,7	99,8	5,94
41,4	28,6	99,8	5,96
41,5	28,8	99,8	5,95
41,6	28,9	99,8	5,94
41,7	28,7	99,8	5,95
41,8	28,8	99,8	5,94
41,9	28,7	99,8	5,94
42,0	28,9	99,8	5,94
42,0	28,7	99,8	5,94

42,1	28,7	99,8	5,94
42,2	28,7	99,8	5,95
42,3	28,6	99,8	5,94
42,4	28,6	99,8	5,94
42,5	28,7	99,8	5,94
42,6	28,7	99,8	5,95
42,7	28,6	99,8	5,94
42,8	28,6	99,8	5,94
42,9	28,6	99,8	5,94
43,0	28,8	99,8	5,95
43,1	28,8	99,8	5,94
43,2	28,7	99,8	5,95
43,3	28,7	99,8	5,94
43,4	28,8	99,8	5,94
43,5	28,8	99,8	5,93
43,6	28,6	99,8	5,94
43,7	28,8	99,8	5,94
43,8	28,7	99,8	5,94
43,9	28,9	99,8	5,94
44,0	28,7	99,8	5,94
44,1	28,7	99,8	5,94
44,2	28,7	99,8	5,94
44,3	28,8	99,8	5,94
44,4	28,7	99,8	5,94
44,4	28,8	99,8	5,94
44,5	28,8	99,8	5,93
44,6	28,7	99,8	5,95
44,7	28,7	99,8	5,94
44,8	28,7	99,8	5,94
44,9	28,5	99,8	5,95
45,0	28,8	99,8	5,94
45,1	28,8	99,8	5,93
45,2	28,6	95,7	5,94
45,3	28,6	95,7	5,94
45,4	28,9	95,7	5,94
45,5	28,8	95,6	5,94
45,6	28,6	95,4	5,94
45,7	28,6	95,3	5,94
45,8	28,8	95,2	5,95
45,9	28,5	95,2	5,94
46,0	28,7	95,2	5,94
46,1	28,7	95,2	5,94
46,2	28,8	95,2	5,94
46,3	28,6	95,2	5,95
46,4	28,6	95,1	5,94
46,5	28,9	95,0	5,95
46,6	28,6	95,0	5,94

46,7	28,8	95,0	5,95
46,8	28,6	94,9	5,95
46,8	28,7	94,9	5,95
46,9	28,7	94,8	5,94
47,0	28,6	94,6	5,95
47,1	28,7	94,6	5,94
47,2	28,7	94,5	5,95
47,3	28,7	94,5	5,94
47,4	28,5	94,6	5,96
47,5	28,6	94,6	5,94
47,6	28,8	94,5	5,94
47,7	28,7	94,5	5,94
47,8	28,7	94,4	5,95

## EXPÉRIENCE G

**Tableau 44:** Valeur des dénombrements des cellules et spores viables, des taux de sporulation et de l'entomotoxicité durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience G :** un choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).

Temps (hres)	Comptes UFC / ml		Sporulation (%)	Entomotoxicité UI / µl
	totaux	spores		
0	7,30E+06	6,80E+03	0,1	
3	9,00E+06	4,00E+04	0,4	
6	2,31E+07	1,84E+06	8,0	
9	1,05E+08	2,12E+06	2,0	
12	1,20E+08	3,30E+06	2,8	
15	2,00E+08	5,00E+06	2,5	
16	2,30E+08	1,00E+07	4,3	
18	2,70E+08	1,80E+08	66,7	
21	4,40E+08	4,10E+08	93,2	
24	4,20E+08	3,70E+08	88,1	11848
25	4,90E+08	4,70E+08	95,9	
27	4,80E+08	4,65E+08	96,9	
30	5,30E+08	4,65E+08	87,7	13061
33	5,40E+08	4,80E+08	88,9	
36	4,95E+08	4,50E+08	90,9	12488
48	4,40E+08	3,70E+08	84,1	11730

**Tableau 45:** Données brutes pour la température (Temp.), l'oxygène dissous (OD) et le pH durant une fermentation de boues secondaires (CUQ, 23-07-99) par Btk en bioréacteur. **Expérience G :** 1 choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).

T (h)	Temp. (°C)	OD (%)	pH
0,0	30,5	98,5	6,86
0,1	30,8	96,5	6,84
0,2	31,0	99,7	6,83
0,3	30,5	98,3	6,85
0,4	30,6	94,9	6,83
0,5	30,6	92,6	6,82
0,6	30,5	90,2	6,81
0,7	31,0	89,4	6,80
0,8	30,8	90,0	6,80
0,9	30,7	90,0	6,82
1,0	30,7	90,0	6,80
1,1	30,7	89,0	6,87
1,2	30,7	89,0	6,84
1,2	31,3	89,3	6,82
1,3	31,1	89,6	6,80

1,4	30,8	88,0	6,88
1,5	30,7	88,0	6,86
1,6	30,9	88,6	6,83
1,7	31,0	89,2	6,80
1,8	30,8	89,9	6,92
1,9	30,7	89,9	6,88
2,0	30,7	89,5	6,85
2,1	30,6	89,7	6,82
2,2	30,7	89,5	6,82
2,3	30,9	86,7	6,93
2,4	30,7	86,3	6,88
2,5	30,8	85,8	6,86
2,6	31,0	84,0	6,80
2,7	31,2	84,7	6,92
2,8	30,6	83,8	6,87
2,9	30,7	82,6	6,82

3,0	30,8	81,3	6,78
3,1	31,2	80,0	6,80
3,2	30,8	79,0	6,82
3,3	31,2	77,7	6,78
3,4	30,8	76,8	6,82
3,5	31,2	75,1	6,79
3,6	31,0	72,0	6,80
3,6	30,9	70,7	6,81
3,7	31,1	68,7	6,80
3,8	30,9	66,9	6,80
3,9	30,7	64,6	6,79
4,0	30,2	63,0	6,82
4,1	30,8	62,0	6,83
4,2	30,5	61,0	6,84
4,3	30,8	52,7	6,89
4,4	30,1	46,2	6,92

4,5	30,4	41,2	6,94
4,6	30,1	34,5	6,97
4,7	30,7	22,8	7,00
4,8	30,1	24,5	7,03
4,9	30,6	24,3	7,06
5,0	30,2	24,3	7,08
5,1	30,7	24,2	7,11
5,2	30,5	24,1	7,14
5,3	30,1	24,1	7,17
5,4	30,8	24,0	7,17
5,5	30,5	24,0	7,21
5,6	30,4	23,9	7,07
5,7	30,6	23,8	7,14
5,8	30,1	23,8	7,17
5,9	30,4	23,9	7,20
6,0	30,3	24,1	7,21

6,0	30,4	24,3	7,21
6,1	30,2	24,3	7,20
6,2	30,2	26,4	7,21
6,3	30,4	24,1	7,20
6,4	30,4	24,2	7,15
6,5	30,2	24,1	7,20
6,6	30,3	24,1	7,15
6,7	30,5	24,0	7,21
6,8	31,1	24,0	7,20
6,9	30,7	23,9	7,20
7,0	30,5	23,8	7,15
7,1	30,6	23,7	7,21
7,2	30,6	23,8	7,19
7,3	30,7	24,1	7,18
7,4	30,1	24,0	7,20
7,5	30,6	23,9	7,20
7,6	30,7	25,4	7,21
7,7	30,6	24,9	7,19
7,8	30,5	25,0	7,20
7,9	30,7	29,0	7,17
8,0	30,7	30,0	7,15
8,1	30,4	30,5	7,20
8,2	30,6	30,6	7,16
8,3	30,6	30,2	7,21
8,4	30,2	28,4	7,20
8,4	30,7	28,0	7,12
8,5	30,1	27,2	7,16
8,6	30,2	26,8	7,21
8,7	30,5	26,5	7,21
8,8	30,6	26,7	7,19
8,9	30,6	27,1	7,21
9,0	30,5	43,9	7,17
9,1	30,7	49,9	7,21
9,2	30,6	49,9	7,20
9,3	30,4	99,7	7,17
9,4	30,7	99,7	7,22
9,5	30,5	99,7	7,20
9,6	30,2	99,7	7,20
9,7	30,7	99,7	7,14
9,8	30,4	99,7	7,20
9,9	30,4	99,7	7,20
10,0	30,3	99,7	7,21
10,1	30,5	99,7	7,20
10,2	30,5	99,7	7,22
10,3	30,1	97,7	7,21
10,4	30,4	90,0	7,21
10,5	30,6	85,6	7,20
10,6	30,7	82,9	7,20

10,7	30,3	80,8	7,21
10,8	30,2	78,3	7,20
10,8	30,6	76,0	7,20
10,9	30,9	73,9	6,99
11,0	30,2	72,2	7,08
11,1	30,7	70,1	7,12
11,2	30,0	67,4	7,16
11,3	30,0	67,8	7,19
11,4	30,4	66,1	7,20
11,5	30,0	63,8	7,14
11,6	30,0	62,8	7,16
11,7	30,6	61,8	7,20
11,8	30,7	63,2	7,14
11,9	30,6	60,1	7,17
12,0	30,5	59,6	7,20
12,1	30,4	58,3	7,16
12,2	30,5	56,3	7,20
12,3	30,7	56,8	7,04
12,4	30,4	56,5	7,10
12,5	30,5	55,9	7,15
12,6	30,6	53,7	7,18
12,7	30,4	53,2	7,20
12,8	30,6	52,6	7,22
12,9	30,3	54,6	7,15
13,0	30,4	53,0	7,17
13,1	30,5	49,7	7,21
13,2	30,6	49,5	7,17
13,2	30,4	51,3	7,20
13,3	30,5	49,4	7,16
13,4	30,6	49,1	7,20
13,5	30,3	49,4	7,15
13,6	30,8	48,6	7,17
13,7	30,6	49,7	7,20
13,8	30,2	48,4	7,09
13,9	30,5	48,3	7,14
14,0	30,5	46,9	7,17
14,1	30,5	46,2	7,21
14,2	30,8	46,9	7,20
14,3	30,6	45,5	7,15
14,4	30,2	46,4	7,20
14,5	30,7	45,9	7,16
14,6	30,7	44,9	7,21
14,7	31,0	47,0	7,16
14,8	30,7	45,1	7,87
14,9	30,8	44,9	7,81
15,0	30,6	44,9	7,75
15,1	30,6	43,9	7,69
15,2	30,6	43,5	7,70

15,3	30,7	43,1	7,73
15,4	30,1	43,3	7,90
15,5	30,7	42,9	7,85
15,6	30,4	42,9	7,79
15,6	30,7	42,9	7,79
15,7	30,9	46,5	7,83
15,8	30,9	43,2	7,79
15,9	30,7	43,1	7,83
16,0	30,9	42,6	7,82
16,1	30,2	44,0	7,79
16,2	30,7	42,9	7,78
16,3	30,8	42,6	7,84
16,4	30,6	41,9	7,82
16,5	30,6	42,1	7,81
16,6	30,6	41,3	7,80
16,7	30,4	41,2	7,80
16,8	30,4	41,2	7,80
16,9	30,8	41,3	7,80
17,0	30,3	41,6	7,79
17,1	30,5	40,7	7,81
17,2	30,4	40,9	7,81
17,3	30,4	40,3	7,82
17,4	30,6	40,4	7,82
17,5	30,4	40,0	7,82
17,6	30,2	40,2	7,82
17,7	30,4	39,9	7,84
17,8	30,4	39,6	7,83
17,9	30,6	39,9	7,03
18,0	30,5	40,5	7,15
18,0	30,4	39,9	7,20
18,1	30,4	39,8	7,18
18,2	30,6	39,5	7,21
18,3	30,5	39,1	7,20
18,4	30,5	39,0	7,20
18,5	30,7	38,9	7,10
18,6	30,6	38,8	7,20
18,7	30,5	38,9	7,21
18,8	30,6	38,7	7,15
18,9	30,2	39,8	7,20
19,0	30,3	40,9	7,15
19,1	30,2	40,6	7,22
19,2	30,4	40,5	7,16
19,3	30,2	40,5	7,20
19,4	30,4	40,3	7,14
19,5	30,3	40,3	7,21
19,6	30,4	40,2	7,11
19,7	30,5	40,3	7,17
19,8	30,4	39,9	7,20

19,9	30,2	39,9	7,17
20,0	30,8	39,5	7,20
20,1	30,2	39,1	7,15
20,2	30,5	38,7	7,19
20,3	30,2	39,4	7,20
20,4	30,8	38,4	7,17
20,4	30,4	39,8	7,12
20,5	30,8	38,1	7,19
20,6	30,6	38,1	7,06
20,7	30,1	37,9	7,14
20,8	30,5	38,0	7,20
20,9	30,4	37,9	7,13
21,0	30,5	37,6	7,17
21,1	30,5	37,3	7,16
21,2	30,6	36,9	7,21
21,3	30,6	36,5	7,15
21,4	30,5	36,3	7,20
21,5	30,4	36,2	7,19
21,6	30,7	35,8	7,19
21,7	30,7	35,8	7,17
21,8	30,2	35,8	7,10
21,9	30,1	35,6	7,17
22,0	30,2	35,7	7,20
22,1	30,1	35,5	7,19
22,2	30,5	35,3	7,18
22,3	30,1	35,3	7,19
22,4	30,1	35,3	7,21
22,5	30,2	35,3	7,20
22,6	30,0	35,7	7,14
22,7	30,4	36,4	7,20
22,8	30,3	35,7	7,18
22,8	30,2	35,6	7,20
22,9	30,6	35,7	7,22
23,0	30,2	35,6	7,14
23,1	30,1	35,6	7,20
23,2	30,6	35,5	7,17
23,3	30,9	35,5	7,14
23,4	30,1	35,7	7,20
23,5	30,1	35,5	7,16
23,6	30,1	35,8	7,21
23,7	30,6	36,0	7,86
23,8	30,3	35,2	7,79
23,9	30,4	34,9	7,79
24,0	30,6	35,0	7,81
24,1	30,2	35,4	7,82
24,2	30,6	35,8	7,87
24,3	30,2	35,9	7,85
24,4	30,8	35,9	7,83

## ANNEXE-13 (suite)

24,5	30,5	35,8	7,82	29,1	30,1	32,5	6,15	33,7	30,7	32,4	6,07	38,3	27,2	30,5	6,21
24,6	30,6	35,8	7,80	29,2	30,3	32,4	6,17	33,8	30,5	32,4	6,09	38,4	27,1	30,6	6,13
24,7	30,8	35,8	7,79	29,3	30,3	32,4	6,18	33,9	30,5	32,2	6,12	38,5	27,1	30,5	6,14
24,8	30,3	35,9	7,85	29,4	30,2	32,2	6,20	34,0	30,6	32,2	6,14	38,6	27,1	30,5	6,16
24,9	30,2	35,8	7,83	29,5	30,3	32,2	6,18	34,1	30,6	32,2	6,16	38,7	27,3	30,4	6,17
25,0	30,6	35,8	7,83	29,6	30,6	32,4	6,20	34,2	30,1	32,2	6,18	38,8	27,5	31,2	6,17
25,1	30,3	35,7	7,83	29,7	30,5	32,6	6,16	34,3	30,0	32,2	6,21	38,9	27,1	32,7	6,18
25,2	30,6	35,6	7,82	29,8	30,6	32,4	6,18	34,4	30,6	32,4	6,22	39,0	27,0	33,0	6,20
25,2	30,2	35,6	7,83	29,9	30,0	32,4	6,20	34,5	30,0	32,6	6,10	39,1	27,1	33,9	6,15
25,3	30,3	35,6	7,83	30,0	30,1	32,2	6,21	34,6	30,1	32,4	6,11	39,2	27,1	33,7	6,15
25,4	30,5	35,4	7,83	30,0	30,6	32,1	6,11	34,7	30,7	32,5	6,14	39,3	27,2	33,5	6,18
25,5	30,2	35,2	7,84	30,1	29,9	32,2	6,12	34,8	30,7	33,2	6,16	39,4	27,4	33,4	6,17
25,6	30,4	35,0	7,84	30,2	30,8	32,0	6,14	34,8	30,8	32,7	6,16	39,5	27,2	33,2	6,18
25,7	30,5	35,1	7,83	30,3	30,2	32,0	6,16	34,9	30,5	32,4	6,18	39,6	27,1	32,9	6,20
25,8	30,3	35,0	7,84	30,4	30,8	31,9	6,17	35,0	29,7	32,4	6,21	39,6	27,1	32,8	6,21
25,9	30,5	35,0	7,83	30,5	30,4	31,8	6,18	35,1	29,0	32,1	6,15	39,7	27,2	33,6	6,17
26,0	30,6	34,9	7,85	30,6	30,0	31,8	6,20	35,2	28,3	31,8	6,18	39,8	27,2	32,9	6,17
26,1	30,1	34,7	7,85	30,7	30,6	31,7	6,22	35,3	27,6	31,4	6,20	39,9	27,1	32,5	6,18
26,2	30,4	34,6	7,86	30,8	30,5	31,8	6,17	35,4	27,7	31,1	6,21	40,0	27,1	33,5	6,20
26,3	30,2	34,5	7,85	30,9	30,5	31,8	6,17	35,5	27,5	30,9	6,21	40,1	27,2	33,1	6,21
26,4	30,5	34,4	7,86	31,0	30,1	31,7	6,20	35,6	27,3	30,7	6,15	40,2	27,2	33,0	6,11
26,5	30,0	34,7	7,86	31,1	30,4	31,6	6,21	35,7	27,5	30,4	6,17	40,3	27,2	32,9	6,13
26,6	30,3	34,2	7,86	31,2	30,5	31,6	6,11	35,8	27,5	30,4	6,18	40,4	27,1	32,8	6,15
26,7	30,0	34,1	7,86	31,3	29,9	31,5	6,12	35,9	27,4	30,3	6,18	40,5	27,5	32,7	6,16
26,8	30,6	35,2	6,22	31,4	30,6	31,4	6,14	36,0	27,1	30,2	6,22	40,6	27,0	32,6	6,16
26,9	30,4	35,4	6,11	31,5	30,6	31,3	6,15	36,1	27,3	30,2	6,14	40,7	27,1	32,6	6,18
27,0	30,1	35,1	6,21	31,6	30,0	31,1	6,17	36,2	27,3	30,2	6,16	40,8	27,1	32,6	6,18
27,1	30,5	35,0	6,13	31,7	30,6	31,0	6,18	36,3	27,2	30,1	6,17	40,9	27,2	32,6	6,20
27,2	30,2	35,0	6,20	31,8	30,5	31,2	6,20	36,4	27,3	30,2	6,18	41,0	27,3	32,6	6,22
27,3	30,4	34,8	6,16	31,9	30,1	31,0	6,21	36,5	27,4	30,1	6,20	41,1	27,1	32,6	6,21
27,4	29,9	34,8	6,21	32,0	30,5	30,9	6,15	36,6	27,2	30,1	6,21	41,2	27,2	32,6	6,10
27,5	30,0	34,5	6,12	32,1	30,5	30,9	6,17	36,7	27,4	30,2	6,16	41,3	27,0	32,5	6,10
27,6	30,6	34,2	6,17	32,2	30,6	30,9	6,18	36,8	27,4	30,2	6,17	41,4	27,1	32,5	6,12
27,6	30,0	34,0	6,20	32,3	30,8	31,1	6,21	36,9	27,4	30,3	6,18	41,5	27,2	32,5	6,14
27,7	30,1	33,9	6,12	32,4	30,5	31,1	6,10	37,0	27,5	30,2	6,20	41,6	27,1	32,5	6,14
27,8	30,2	33,8	6,17	32,4	30,0	31,2	6,13	37,1	27,3	30,2	6,21	41,7	27,2	32,4	6,15
27,9	30,1	33,7	6,18	32,5	30,7	31,3	6,16	37,2	27,4	30,3	6,18	41,8	27,0	32,4	6,16
28,0	30,6	33,7	6,21	32,6	30,3	31,7	6,17	37,2	27,4	30,3	6,20	41,9	27,1	32,4	6,16
28,1	30,1	33,4	6,12	32,7	30,5	32,2	6,20	37,3	27,2	30,4	6,21	42,0	27,1	32,4	6,17
28,2	30,5	33,4	6,15	32,8	30,9	32,2	6,16	37,4	27,2	30,4	6,10	42,0	27,3	32,4	6,18
28,3	30,2	33,2	6,17	32,9	30,5	32,2	6,18	37,5	27,3	30,4	6,11	42,1	27,1	32,4	6,18
28,4	30,9	33,2	6,20	33,0	30,6	32,2	6,21	37,6	27,3	30,4	6,12	42,2	27,3	32,4	6,20
28,5	30,0	33,2	6,14	33,1	30,0	32,0	6,12	37,7	27,4	30,5	6,14	42,3	27,3	32,4	6,15
28,6	30,2	32,9	6,17	33,2	30,0	32,0	6,15	37,8	27,6	30,5	6,15	42,4	27,1	32,4	6,16
28,7	30,8	32,8	6,20	33,3	30,1	32,0	6,17	37,9	27,4	30,5	6,16	42,5	27,4	32,4	6,17
28,8	30,2	32,7	6,21	33,4	30,5	32,0	6,20	38,0	27,4	30,4	6,17	42,6	27,1	32,4	6,18
28,9	30,3	32,6	6,21	33,5	30,2	31,9	6,20	38,1	27,4	30,5	6,18	42,7	27,5	32,4	6,18
29,0	30,9	32,5	6,13	33,6	30,5	32,1	6,04	38,2	27,5	30,5	6,20	42,8	27,2	32,3	6,18

42,9	27,4	32,3	6,20
43,0	27,2	32,4	6,12
43,1	27,2	32,4	6,14
43,2	27,4	32,4	6,15
43,3	27,4	32,4	6,16
43,4	27,5	32,3	6,17
43,5	27,2	32,4	6,17
43,6	27,3	32,4	6,18
43,7	27,3	32,4	6,21
43,8	27,2	32,4	6,20
43,9	27,1	32,3	6,13
44,0	27,6	32,4	6,15
44,1	27,2	32,4	6,16
44,2	27,4	32,2	6,16
44,3	27,3	32,3	6,17
44,4	27,3	32,2	6,18
44,4	27,5	32,4	6,18
44,5	27,3	32,4	6,20
44,6	27,5	32,2	6,22
44,7	27,5	32,2	6,20
44,8	27,5	32,1	6,22
44,9	27,4	32,0	6,09
45,0	27,4	31,9	6,10
45,1	27,4	31,6	6,11
45,2	27,3	31,6	6,11
45,3	27,3	31,5	6,12
45,4	27,5	31,5	6,14
45,5	27,3	31,3	6,15
45,6	27,2	31,2	6,16
45,7	27,6	31,2	6,16
45,8	27,2	31,2	6,18
45,9	27,2	31,1	6,18
46,0	27,2	31,0	6,20
46,1	27,3	31,0	6,20
46,2	27,4	30,9	6,21
46,3	27,4	31,0	6,15
46,4	27,3	31,0	6,15
46,5	27,3	31,0	6,16
46,6	27,3	31,0	6,17
46,7	27,2	31,0	6,18
46,8	27,3	30,9	6,18
46,8	27,5	30,8	6,20
46,9	27,7	30,7	6,21
47,0	27,3	30,5	6,21
47,1	27,2	30,4	6,18
47,2	27,2	30,4	6,18
47,3	27,3	30,4	6,21
47,4	27,5	30,5	6,15

47,5	27,3	30,6	6,15
47,6	27,5	31,0	6,17
47,7	27,6	31,0	6,17
47,8	27,2	31,0	6,17

## BIOESSAIS

**Tableau 46:** Bioessais sur des larves de *Choristoneura fumiferana* (TBE) et évaluation de l'entomotoxicité de plusieurs échantillons de boues mixtes ou secondaires fermentées par Btk après divers temps (T). Séries d'expériences no.1 à 3 : Btk dans les boues mixtes. Série no.4 : Bt-11 dans les boues mixtes. Séries no.5 et 7 : Btk dans les boues secondaires. Série no.6 : Bt-11 dans les boues secondaires. Expérience A : contrôle en bioréacteur, Btk dans les boues secondaires. Expérience B : choc de pH 7->6->7 (15-18 h). Expérience C : 2 chocs de pH 7->6->7 (15-18 et 24-27 h). Expérience D : 3 chocs de pH 7->6->7 (15-18, 24-27 et 30-33) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). Expérience E : 5 chocs de pH 7->6->7 (15-16, 19-20, 23-24, 27-28 et 31-32 h) et un choc de pH 7->6 (36-48 h). Expérience F : 2 chocs de pH 7->8->6 (15-18-24 et 30-33-48 h). Expérience G : un choc de pH 7->8->7 (15-18 h) et un choc de pH 7->8->6 (24-27-48 h).

No. bioessai*1	Echantillon*2	T (h)	dilution	Nombre mortalité	Nombre total individus*3	mortalité (%)	Entomotoxicité UI / µl
1	Témoin	x	x	2	24	8,3	x
	Standard	x	0	18	18	100,0	12600
			-1	19	20	95,0	
			-2	18	19	94,7	
	Série 1 pH 7->6 (15 h)	48	0	15	18	83,3	10010
			-1	13	17	76,5	
			-2	12	17	70,6	
	Série 1 contrôle, pH 7	48	0	15	16	93,8	10932
			-1	15	16	93,8	
			-2	9	14	64,3	
	Série 1 pH 7->5.5 (15 h)	48	0	17	19	89,5	10746
			-1	17	17	100,0	
			-2	11	19	57,9	
	Série 1 pH 7->5 (15 h)	48	0	3	19	15,8	2519
			-1	4	16	25,0	
			-2	1	17	5,9	
	Série 2 pH 7->6 (15 h)	48	0	19	20	95,0	10261
			-1	12	16	75,0	
			-2	12	18	66,7	
	Série 2 pH 7->6->7 (15-18 h)	48	0	18	18	100,0	12121
			-1	18	18	100,0	
-2			15	19	78,9		

Tableau 46 : (suite)

2	Témoïn	x	x	2	23	8,7	x	
	Standard	x	-1	16	18	88,9	12600	
			-2	17	20	85,0		
			-3	8	18	44,4		
	Série 4 contrôle, pH 7	48	-1	15	18	83,3	9079	
			-2	9	16	56,3		
			-3	5	20	25,0		
	Série 4 pH 7->6 (15 h)	24	-1	13	18	72,2	8048	
			-2	10	18	55,6		
			-3	4	20	20,0		
		48	-1	15	16	93,8	11507	
			-2	10	19	52,6		
			-3	9	19	47,4		
	Série 4 pH 7->6 (24 h)	25	-1	9	17	52,9	8882	
			-2	10	19	52,6		
-3			8	20	40,0			
48		-1	14	18	77,8	10674		
		-2	13	16	81,3			
		-3	6	19	31,6			
Série 4 pH 7->5,5 (24 h)	48	-1	10	19	52,6	10350		
		-2	11	19	57,9			
		-3	9	17	52,9			
3	Témoïn	x	x	2	23	8,7	x	
	Standard	x	-1	17	18	94,4	12600	
			-2	18	19	94,7		
			-3	8	16	50,0		
	Série 2 pH 6	48	-1	9	18	50,0	7376	
			-2	6	18	33,3		
			-3	7	16	43,8		
	Série 3 pH 7->8 ->6 (15-18 h)	48	-1	15	18	83,3	12310	
			-2	14	16	87,5		
			-3	9	16	56,3		
	Série 3 pH 7->8 ->7 (15-18 h)	48	-1	16	19	84,2	9669	
			-2	7	18	38,9		
			-3	9	18	50,0		
	4	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
				-2	19	20	95,0	
-3				15	19	78,5		
-4				7	20	35,0		
-5				9	20	45,0		
Contrôle boues secondaires		48	-1	20	20	100,0	10258	
			-2	14	19	73,7		
			-3	10	19	52,6		
Expérience B		48	-1	19	19	100,0	10555	
			-2	17	19	89,5		
			-3	9	20	40,0		
Expérience C		30	-1	20	20	100,0	12701	
			-2	18	20	90,0		
			-3	17	20	85,0		
		48	-1	19	20	95,0	11447	
	-2		16	20	80,0			
	-3		14	19	73,7			

Tableau 46 : (suite)

5	Standard	x	-1	19	20	95,0	12600	
			-2	18	19	94,7		
			-3	12	20	60,0		
	Expérience D	30		-1	19	20	95,0	12021
				-2	17	20	85,0	
				-3	11	19	57,9	
		36		-1	20	20	100,0	10768
				-2	16	20	80,0	
				-3	8	20	40,0	
		48		-1	20	20	100,0	11577
				-2	14	20	70,0	
				-3	11	19	57,9	
	Expérience E	30		-1	20	20	100,0	12833
				-2	19	20	95,0	
				-3	12	20	60,0	
6	Standard	x	-1	19	19	100,0	12600	
			-2	18	20	90,0		
			-3	15	19	78,9		
	Série 2 Contrôle, pH 7	48		-1				8519
				-2	11	17	64,7	
				-3	10	20	50,0	
	Série 3 pH 7->6 (15 h)	48		-1				10850
				-2	19	20	95,0	
				-3	10	19	52,6	
	Série 5 Contrôle, pH 7	48		-1				11340
				-2	18	20	90,0	
				-3	12	19	63,2	
	Série 5 pH 7->6 (15 h)	48		-1				12714
				-2	11	15	73,3	
				-3	19	20	95,0	
	7	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
				-2	16	18	86,9	
				-3	15	19	78,9	
Série 3 Contrôle, pH 7		48		-1				8419
				-2	15	20	75,0	
				-3	7	18	38,9	
Expérience F		24		-1				11241
				-2	15	17	88,2	
				-3	10	16	62,5	
		30		-1				11492
				-2	15	18	83,3	
				-3	14	20	70,0	
		36		-1	18	19	94,7	12675
				-2	15	19	78,9	
				-3	14	15	93,3	
		48		-1	18	19	94,7	13137
				-2	17	17	100,0	
				-3	15	18	83,3	
Expérience G		24		-1				11848
				-2	16	19	84,2	
				-3	14	19	73,7	
		30		-1				13061
				-2	17	19	89,5	
				-3	16	19	84,2	
		36		-1	18	20	90,0	12488
				-2	17	19	89,5	
				-3	16	19	84,2	
	48		-1	19	20	95,0	11730	
			-2	19	20	95,0		
			-3	11	18	61,1		

Tableau 46 : (suite)

8	Standard	x	-1	19	19	100,0	12600
			-2	18	20	90,0	
			-3	15	19	78,9	
	Série 2 Contrôle, pH 7	48	-1				8519
			-2	11	17	64,7	
			-3	10	20	50,0	
	Série 3 Btk, pH 7->6 (15 h)	48	-1				10850
			-2	19	20	95,0	
			-3	10	19	52,6	
	Série 5 pH 7->6 (15 h)	48	-1				12714
			-2	11	15	73,3	
			-3	19	20	95,0	
Contrôle Boues secondaires	24	-1	17	20	85,0	10671	
		-2	17	19	89,5		
		-3	11	20	55,0		
9	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
			-2	16	18	88,9	
			-3	15	19	78,9	
			-4	9	19	47,4	
	Série no.5 pH 7->6 (24-48 h)	48	-2	17	18	94,4	11973
			-3	14	17	82,4	
			-4	6	17	35,3	
	Série no.6 pH 7->6 (15-48 h)	48	-1	11	20	55,0	6410
			-2	9	19	47,4	
			-3	7	20	35,0	
	Série no.6 pH 7->6 (24-48 h)	48	-1	12	20	60,0	7436
			-2	8	18	44,4	
-3			9	17	52,9		
10	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
			-2	14	15	93,3	
			-3	17	20	85,0	
	Expérience A	48	-1	15	15	100,0	10363
			-2	12	14	85,7	
			-3	7	15	46,7	
	Expérience C	24	-1	14	14	100,0	11908
			-2	13	14	92,9	
			-3	10	14	71,4	
	Expérience D	24	-1	11	13	84,6	9239
			-2	10	14	71,4	
			-3	6	12	50,0	
Expérience E	24	-1	13	13	100,0	10924	
		-2	13	15	86,7		
		-3	8	14	57,1		

## ANNEXE-14 (suite)

Tableau 46 : (suite)

11	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
			-2	20	20	100,0	
			-3	18	20	90,0	
	Série no.6 Contrôle, pH 7	48	-1	16	17	94,1	8648
			-2	13	20	65,0	
			-3	8	19	42,1	
	Expérience B	24	-1	20	20	100,0	10529
			-2	13	16	84,3	
			-3	10	16	62,5	
	Expérience E	36	-1	20	20	100,0	11776
			-2	16	18	88,9	
			-3	14	17	82,4	
	Expérience E	48	-1	20	20	100,0	10293
			-2	15	18	83,3	
			-3	10	18	55,6	
Expérience A	24	-1	20	20	100,0	10329	
		-2	16	19	84,2		
		-3	10	18	55,6		
Expérience A	30	-1	20	20	100,0	10792	
		-2	14	16	87,5		
		-3	10	16	62,5		
Expérience A	36	-1	20	20	100,0	11664	
		-2	18	20	90,0		
		-3	15	19	78,9		
12	Standard	x	-1	15	15	100,0	12600
			-2	14	15	93,3	
			-3	11	15	73,3	
	Série no.7 Contrôle, 30°C	48	-1	14	14	100,0	10716
			-2	10	13	76,9	
			-3	8	15	53,3	
	Série no.7 30->40->30°C (15-16 h)	30	-1	9	13	69,2	9371
			-2	12	15	80,0	
			-3	7	14	50,0	
		48	-1	9	13	69,2	9307
			-2	11	14	78,6	
			-3	7	14	50,0	
	Série no.7 30->40->30°C (24-25 h)	30	-1	7	15	46,7	7526
			-2	9	14	64,3	
			-3	7	15	46,7	
48		-1	13	15	86,7	9613	
		-2	11	15	73,3		
		-3	7	15	46,7		

Tableau 46 : (suite)

13	Standard	x	-1	20	20	100,0	12600
			-2	18	20	90,0	
			-3	12	20	60,0	
	Série 7 Contrôle, 30°C	24	-1	13	17	76,5	7878
			-2	7	19	36,8	
			-3	8	19	42,1	
	Série 7 Contrôle, 30°C	30	-1	14	18	77,8	7796
			-2	8	17	47,1	
			-3	8	18	33,3	
	Série 7 30->40->30°C (15-16 h)	24	-1	10	19	52,6	7725
			-2	7	20	55,0	
			-3	5	18	42,1	
	Série 7 30->40->30°C (24-25 h)	24	-1	10	19	52,6	5788
			-2	7	20	35,0	
			-3	5	18	27,8	

\*1 Les résultats pour les témoins (bioessais no.4-13) et la première dilution (bioessais no.6-8) ne sont pas disponibles.

\*2 Standard = préparation commerciale Foray™.

\*3 Initialement, 25 individus pour les témoins et 20 pour le standard et les échantillons. Des évasions par les trous du bouchons ou des morts causées par des facteurs externes (ex. : noyée par l'humidité formée suite à une exposition trop proche de la lampe lumineuse) peuvent avoir diminuées le nombre total d'individus. Pour les bioessais no.10 et 12, le nombre initial d'individus était de 15 compte tenu du nombre limité de larves durant les manipulations expérimentales.

