Université du Québec

INRS-ETE

Caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* d'intérêt pour la production de biopesticides et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales

Par
Eve Lamontagne
B. Sc. Microbiologie

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

Jury d'évaluation

Examinateur Externe	**MadameNicole Benhamou** **Faculté des sciences de l'agriculture** **Et de l'alimentation**
Examinateur Interne	**Monsieur Jean-Louis Sasseville** **INRS-ETE** **Université du Québec**
Directeur de recherche	**Monsieur Rajeshwar D. Tyagi** **INRS-ETE** **Université du Québec**

Janvier 2004

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur R.D. Tyagi pour les encouragements tout au long de mes travaux. Je remercie également Madame Nicole Benhamou et Monsieur Jean-Louis Sasseville pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Merci à tous les gens que j'ai eu la chance de côtoyer au complexe scientifique et au Carrefour Molson. Plus particulièrement Islem Yezza qui m'a énormément aidé lors de la rédaction de ce mémoire et Simon Barnabé qui a été d'une aide précieuse pour le travail de laboratoire. Un merci particulier à Marie-Eve Leblanc qui fut d'un soutien considérable durant ces deux années au laboratoire et dans la vie de tous les jours. Merci également à toute ma famille et mes amis qui m'ont encouragée lors de mes études. Finalement, je remercie l'INRS-ETE pour son soutien financier.

RÉSUMÉ

Les pesticides chimiques sont utilisés depuis plusieurs décennies et causent beaucoup de dommages à l'environnement puisqu'ils ne sont pas biodégradables et peuvent s'accumuler dans l'environnement. Les biopesticides représentent une bonne alternative aux produits chimiques et *Bacillus thuringiensis* est la bactérie la plus populaire dans ce marché. Par contre, sa production est très coûteuse, mais peut être optimisée si on produit également suffisamment de protéases. Celles-ci sont utilisées dans plusieurs secteurs et présentent un potentiel commercial important.

Le présent projet de recherche a pour but de tester plusieurs nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* (Bt) ayant été isolées de biosolides. L'intérêt de ces travaux est triple puisque, en premier lieu, il s'agit de vérifier si la croissance des bactéries ce fait aussi bien en milieu synthétique qu'en biosolides, les boues d'épuration municipales. Celles-ci possèdent des éléments nutritifs qui devraient pouvoir supporter la croissance des micro-organismes. En deuxième temps, on veut vérifier que le potentiel entomotoxique de la bactérie n'est pas altéré lorsque la fermentation a lieu dans les biosolides. Enfin, Bt produisant des enzymes protéolytiques présentant un potentiel commercial, une évaluation de l'activité protéolytique est menée afin de mesurer si la production d'enzymes est assez importante pour optimiser le procédé de production passablement coûteux. De plus, ces expériences permettent de recycler un sous-produit issu du traitement des eaux usées et dont la disposition est généralement dispendieuse.

La croissance des bactéries se fait à l'aide de fermenteurs de 15 litres dans lesquels on peut contrôler différents paramètres, tels que la température, le pH, l'aération et l'agitation. Les micro-organismes sont cultivés dans le milieu synthétique et les biosolides. Tout au long de la fermentation, on procède au dénombrement des cellules et des spores afin de s'assurer de la croissance des bactéries. On peut ensuite procéder à l'évaluation des protéases et des entomotoxines produites lors de la fermentation. On peut comparer les résultats obtenus par rapport à des préparations utilisées en industrie. Il est également important de procéder à la caractérisation des protéases, afin de s'assurer de leur nature alcaline. On effectue ainsi des

expériences visant à évaluer l'effet sur les protéases d'un changement de pH et de la température ou de l'addition d'inhibiteurs de protéases. La thermostabilité des protéases est également vérifiée, ainsi que l'effet des ions Ca^{2+} sur celle-ci, afin d'évaluer si la stabilité est augmentée.

Les travaux portant sur Bt ont démontré que la croissance de cette bactérie productrice d'entomotoxines et d'enzymes protéolytiques dans les boues d'épuration est comparable à celle obtenue en milieu synthétique. Les biosolides possèdent les éléments nutritifs nécessaires à la croissance de Bt et à la production des toxines et des protéases. Il est toutefois important de considérer les caractéristiques des biosolides. En effet, les résultats obtenus suggèrent qu'il est préférable d'opter pour des boues secondaires ayant un contenu en solides en suspension élevé (environ 25g/L) afin d'éviter une carence en éléments nutritifs et en substrats organiques pour une croissance optimale.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....i
RÉSUMÉ.....ii
TABLE DES MATIÈRES.....iii
LISTE DES TABLEAUX.....v
LISTE DES FIGURES.....vi

INTRODUCTION.....1

1. REVUE DE LITTÉRATURE.....3
1.1 FERMENTATION DE *Bacillus thuringiensis* (Bt).....3
1.1.1 Milieux synthétiques et alternatifs.....3
1.1.2 Milieu de culture à base de biosolides.....4
1.1.3 Croissance de Bt.....5
1.1.4 Demande en oxygène dissous.....7

1.2. PRODUCTION DE BIOPESTICIDES.....8
1.2.1. Les entomotoxines de Bt.....8
1.2.2 Structure des entomotoxines.....9
1.2.3 Entomotoxicité.....11

1.3. LA PRODUCTION DES PROTÉASES.....12
1.3.1 Structure moléculaire et mécanisme de protéolyse.....12
1.3.2 Types de protéases.....13
1.3.3 Activité protéolytique chez Bt.....14

1.4 LES TRAVAUX DU GROUPE DE RECHERCHE EN ASSAINISSEMENT DE L'INRS-ETE.....16
1.4.1 Biopesticides.....16
1.4.2 Biofertilisants et bioplastiques.....18
1.4.3 Enzymes protéolytiques.....18

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....20
1.4.1 Hypothèses de recherche.....20
1.4.2 Objectifs spécifiques de recherche.....21

3. PROCESSUS MÉTHODOLOGIQUE.....22
3.1 Souches de bactéries.....22
3.2 Échantillons de biosolides.....22
3.3 Milieu synthétique.....23
3.4 Inoculum et conditions de culture.....24
3.5 Expériences en fermenteur.....24
3.6 Analyse des échantillons.....25
3.7 Mesure de l'activité protéolytique.....25
3.8 Bioessais.....26

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....28
4.1 DÉCOMPTE DES CELLULES ET SPORES VIABLES.....28
4.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....36
4.2.1 Courbe d'étalonnages de tyrosine.....36
4.2.2 Activité enzymatique des nouvelles souches.....36
4.3 CARACTÉRISATION DES PROTÉASES.....44
4.3.1 Température et pH.....44
4.3.2 Thermostabilité et effets des ions Ca^{2+}.....55
4.3.3 Réactivation.....61
4.3.4 Inhibiteurs de protéases (PMSF et EDTA).....67
4.4 ENTOMOTOXICITÉ.....74
4.5 ÉTUDE DU COEFFICIENT DE TRANSFERT VOLUMÉTRIQUE.....77
4.6 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS POUR LES NOUVELLES SOUCHES DE *BACILLUS THURINGIENSIS*.....84
4.6.1 Bt var. *kurstaki*.....84
4.6.2 Les nouvelles souches de Bt.....84

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....86

BIBLIOGRAPHIE.....89

ANNEXES.....99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes *cry* de Bt (Copping et Menn, 2000).....10

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de la CUQ.....23

Tableau 3 : Composition de la diète artificielle.....27

Tableau 4 : Taux de croissance spécifique maximal (μ max) pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....33

Tableau 5 : Absorbance mesurée à 275 nm selon les concentrations de tyrosine.....36

Tableau 6 : Identification des échantillons des différentes souches de Bt utilisées pour la caractérisation des protéases.....43

Tableau 7 : Tableau comparatif de l'entomotoxicité après 48 heures et des activités enzymatiques maximales pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....75

Tableau 8 : Résultats obtenus lors de l'étude du coefficient de transfert volumétrique pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pour les 24 premières heures.....78

Tableau 9 : Résultats obtenus lors de l'étude du coefficient de transfert volumétrique d'oxygène pour les souches Bt8 et Bt 12 cultivées en biosolides et en milieu soya dans un fermenteur de 15 litres à 3, 6 et 12 heures.....82

Tableau 10 : Résultats pour les principaux paramètres étudiés chez les nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées dans les biosolides.....83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Cellules et spores de Bt.....3

Figure 2 Protéines cristallines de Bt.....11

Figure 3 Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....29

Figure 4 Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....37

Figure 5 Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....45

Figure 6 Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.....56

Figure 7 Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.....62

Figure 8 Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....68

Figure 9 Entomotoxicité sur des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.....74

INTRODUCTION

La lutte aux insectes nuisibles s'est faite grâce à des pesticides chimiques durant plusieurs décennies. Depuis quelques années, les communautés ont été sensibilisées aux graves conséquences qu'entraînait l'usage de ces produits dangereux. L'accumulation de ces substances chimiques dans les sols et les cours d'eau menace l'environnement et les récoltes et peut même mettre en danger les populations. Une alternative aux pesticides s'imposant, le monde scientifique s'est mis à la recherche d'un produit biodégradable, plus sélectif que les substances chimiques et sans danger pour les plantes, les animaux et les humains.

De tous les micro-organismes pouvant servir de biopesticides, *Bacillus thuringiensis* (Bt) est celui qui a été le plus utilisé. Ce bâtonnet Gram-positif produit des inclusions parasporales contenant des cristaux protéiques ou δ-endotoxines, qui sont toxiques envers une grande variété d'insectes. La production industrielle de Bt utilise habituellement un milieu synthétique, mais d'autres substrats peuvent être employés pour supporter sa croissance. La compétition du marché des biopesticides exige des produits à faible prix, nécessitant ainsi des réductions majeures dans les coûts de production. L'utilisation des boues d'épuration comme milieu de culture permet non seulement de produire Bt à faible coût, mais permet aussi la valorisation d'un sous-produit issu du traitement des eaux usées et dont la disposition est généralement dispendieuse.

Afin d'optimiser davantage le procédé de production de Bt, sa capacité de produire des enzymes protéolytiques présentant un potentiel commercial a également été étudiée. L'industrie des enzymes est en pleine expansion puisque son chiffre d'affaire global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80. La plus grande partie de ce marché est liée aux enzymes dites hydrolytiques comme les protéases, les cellulases et les lipases. Les protéases, utilisées principalement dans les détergents, sont les enzymes occupant la plus grande part du marché mondial.

Plusieurs travaux ont été effectués à l'INRS-ETE afin d'optimiser la production de Bt, que ce soit au niveau des procédés de fermentation ou des caractéristiques des biosolides.

Des souches de Bt ont même été isolées directement des boues d'épuration. Le présent projet de recherche vise à tester les nouvelles souches de Bt ayant donné es meilleurs résultats d'entomotoxicité (Bt 4, 6, 8, 12, 14, 21, 24 et a),afin de vérifier l'importance de la production simultanée d'entomotoxines et de d'enzymes protéolytiques. On pourra aussi caractériser les protéases produites en établissant leurs propriétés (température et pH optimum, thermostabilité, effets des ions Ca^{2+}, réactivation et effet des inhibiteurs). Ces expériences consistent également à comparer l'utilisation des boues d'épuration pour la production en bioréacteur de Bt par rapport à l'emploi d'un milieu synthétique.

Le contenu de ce mémoire se subdivise en quatre chapitres. Le premier chapitre introduit Bt et les facteurs importants à se croissance, on y parle ensuite des biopesticides et des enzymes protéolytiques, soit des différents types de protéases, du marché et applications industrielles et des protéases propres à Bt. Ce chapitre contient aussi un bref résumé des travaux effectués par le Groupe de Recherche en Assainissement de l'INRS-ETE. Le chapitre 2 regroupe l'hypothèse de base soutenant la présente étude, ainsi que les objectifs de recherche. Le troisième chapitre décrit la démarche méthodologique. Le chapitre suivant présentent les résultats obtenus lors des expériences : dénombrement des cellules et spores, l'activité enzymatique des souches de Bt, caractérisation des protéases (études sur le pH, la température, la thermostabilité, l'effet des ions Ca^{2+}, la réactivation et les inhibiteurs de protéases), l'entomotoxicité, l'étude sur le coefficient de transfert volumétrique d'oxygène et une synthèse des résultats des nouvelles souches. Par la suite, le chapitre 5 est consacré à la présentation de la conclusion et des recommandations, alors que les références bibliographiques terminent ce document. On retrouve également les annexes à la toute fin.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 FERMENTATION DE *Bacillus thuringiensis* (Bt)

On utilise énormément la bactérie *Bacillus thuringiensis* dans la lutte aux insectes nuisibles. Bt est un bâtonnet Gram-positive, aérobie, mobile, hétéroorganotrophe et sporulant qui produit des inclusions cristallines parasporales durant la phase stationnaire de croissance et/ou la phase de sporulation (Figure 1). Ces cristaux protéiques sont toxiques pour plusieurs espèces d'insectes. Les préparations de Bt sont largement utilisées comme alternative aux pesticides dans la lutte aux insectes nuisibles.

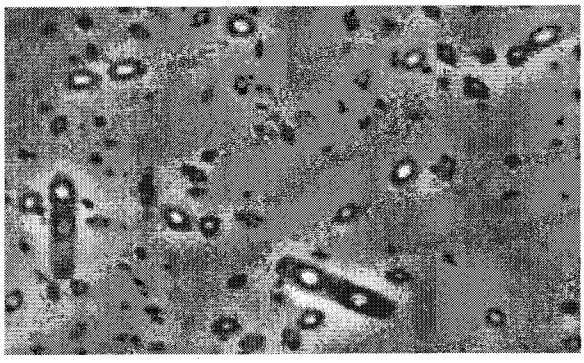


Figure 1 : Cellules et spores de Bt

1.1.1 Milieux synthétiques et alternatifs

La plupart des milieux de culture synthétiques et utilisés en laboratoire permettent d'obtenir de 10^8 à 10^9 cellules viables par millilitre pour des taux de sporulation raisonnables. Pour la production industrielle de masse, il est possible d'optimiser les conditions de culture pour la souche de bactérie utilisée. On peut ainsi obtenir plus de 5×10^9 cellules viables par millilitre, ainsi qu'un taux de sporulation atteignant 90% (Bernard et Utz, 1993). Le milieu de fermentation à base de soya est largement employé pour la culture de Bt en industrie, ainsi qu'en laboratoire (Tyagi *et al.*, 2001). Ce milieu contient les nutriments nécessaires à la croissance de Bt (azote, carbone, éléments minéraux).

Le coût des intrants dans la composition constitue un facteur important du coût de la production de Bt. Plusieurs milieux de culture alternatifs ont été suggérés afin de

diminuer les coûts de production, par exemple : les pelures d'agrumes, la farine de blé ou d'avoine, les noyaux de dattes, le sang de bœuf, la pulpe de ver à soie, la mélasse de canne à sucre et la farine de poisson. Comme beaucoup d'autres micro-organismes utilisés en industrie, Bt ne produit que les quantités de métabolites dont il a besoin, sans excédent. La production commerciale de Bt exige donc une surexpression de ces métabolites et l'optimisation du milieu demeure une variable facilement modifiable (Demain, 2000).

1.1.2 Milieu de culture à base de biosolides

Le traitement des eaux usées génère la production de matières résiduelles appelées boues d'épuration qui peuvent être définies comme tout dépôt, sédiment ou masse visqueuse produits lors du traitement des eaux usées qui se déposent sous forme de matière solide. Les boues d'épuration sont aussi appelées biosolides, terme correspondant à tout produit solide organique issu de traitements privés ou communautaires des eaux usées qui respecte les critères applicables pour leur utilisation bénéfique. Les biosolides sont soit d'origine municipale (réseaux d'égouts), domestique (fosses septique) ou industriels (pâtes et papiers) (MEF, 1998).

Les boues d'épuration possèdent de très bonnes propriétés fertilisantes, notamment en termes de teneurs en azote et phosphore, les rendant particulièrement intéressantes pour diverses biotransformations à haute valeur ajoutée. En effet, leur important pouvoir fermentescible et leur concentration élevée en nutriments en font un milieu idéal pour y cultiver des micro-organismes. Les sous-produits libérés lors de la fermentation peuvent avoir un grand potentiel commercial et pourraient compenser les coûts élevés reliés au transport et à la disposition des boues d'épuration, qui représentent de 30 à 40% des coûts totaux.

Parmi les composés inorganiques usuels se retrouvent l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et l'ensemble des métaux lourds. La matière organique peut se retrouver sous forme non toxique et toxique. Les composés non toxiques constituent la

plus proportion de cette matière; il s'agit de toute la matière d'origine végétale et animale (protéines, acides aminés, sucres et graisses).

1.1.3 Croissance de Bt

Bt est un micro-organisme chimiohétérotrophe présentant un métabolisme complexe encore mal connu. Les voies métaboliques utilisées par Bt sont la glycolyse, le cycle d'acides tricarboxyliques (TCA) et le cycle glycolique. La croissance de Bt se divise en quatre phases distinctes : la phase de latence, la phase exponentielle, la phase de sporulation et la phase de déclin. Les sources de carbone et d'azote sont déterminantes lors de ces phases (Rowe et Margaritis, 1987; Avignone-Rossa et Mignone, 1995).

Plusieurs études ont déterminé que la composition du milieu ainsi que le procédé de fermentation influençaient la toxicité d'une préparation de Bt. La toxicité ne dépend pas du nombre de cellules ou de spores, mais plutôt des caractéristiques de la souche utilisée, ainsi que des conditions de culture (Avignone-Rossa et Mignone, 1993). Les besoins en nutriments diffèrent selon la souche, mais certaines conditions de culture peuvent être établies pour l'ensemble des sous-espèces de Bt (Dulmage *et al*, 1990).

La croissance de Bt se fait entre 15°C et 45°C, avec une croissance optimale entre 26°C et 30°C. Lors des procédés de fermentation, la température est maintenue entre 28°C et 30°C. Pour le pH, la croissance optimale de Bt s'effectue près de la neutralité. Par contre, Bt n'est pas sensible aux variations de pH et la croissance peut survenir à des pH allant de 5.5 à 8.5, avec un pH optimal entre 6.5 et 7.5. Durant la croissance de Bt, des changements importants du pH surviennent et sont dus à la production de métabolismes microbiens (Bernhard et Utz, 1993). Lors de la fermentation en laboratoire, ces variations de pH peuvent être contrôlées par ajout de solutions stériles acides et basiques. Barnabé (2000) a également démontré que des chocs de pH acides et alcalins stimulait la sporulation et la production d'entomotoxines chez Bt.

Deux procédés de fermentation peuvent être utilisés pour la production de Bt : semi-solide ou liquide. La fermentation en milieu semi-solide se prête bien pour les micro-

organismes ayant besoin d'une surface pour se développer, par exemple, les moisissures en font partie. Les nutriments sont contenus dans la matrice poreuse et l'hydratation du milieu doit être maintenue constamment. Les matériaux utilisés pour cette fermentation sont généralement peu dispendieux, ce qui rend le procédé peu coûteux. Par contre, les milieux semi-solides sont difficiles à stériliser et à maintenir stériles, et l'ajustement du pH est également difficile, ce qui n'en fait pas un procédé idéal pour la production de Bt (Dulmage et Rhodes, 1971).

La fermentation liquide demeure le procédé idéal pour la production industrielle de Bt. On peut alors produire des suspensions liquides ou des préparations sèches du complexe spore-cristal. La production en cuvée (batch) est également indiquée pour la fermentation liquide. En effet, la croissance s'effectue jusqu'à épuisement des nutriments et les spores peuvent alors se former, ce qui enclenche la synthèse des δ-endotoxines. À la fin du processus, la cellule relâche le complexe cristal-spore dans le milieu. Plusieurs matériaux peuvent être utilisés pour la fermentation en batch et des milieux peu dispendieux peuvent faire diminuer les coûts du procédé (Dulmage et Rhodes, 1971).

L'addition de certains éléments est requise afin d'assurer une toxicité élevée et une bonne croissance. Par exemple, l'ajout de potassium stimule la production des entomotoxines. La sporulation est stimulée par des ions inorganiques, particulièrement les ions Ca^{2+} et Mn^{2+}. L'ajout d'ions tels que Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Co^{+} et Zn peut améliorer la croissance et la sporulation (Brenhard et Utz, 1993). Il est donc recommandé d'ajouter des sels métalliques ($MnCl_2$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, K_2HPO_4, KCl, etc.) au milieu afin d'obtenir de meilleurs résultats (Abrosimova *et al.*, 1986). Le phosphore est également crucial à la croissance et l'ajout de PO_4^{3-} est essentiel au bon fonctionnement des voies métaboliques (Yang et Wang, 1998).

L'azote peut être assimilé par Bt sous forme d'ions ammonium ou d'acides aminés. Certains travaux ont démontré que l'emploi d'extrait de levure comme seule source d'azote entraînait une toxicité moindre qu'avec l'ajout de $(NH_4)_2SO_4$ (Abdel-Hameed, 1992). La combinaison d'azote organique et inorganique reste la meilleure alternative afin d'obtenir une toxicité élevée. Il est donc nécessaire d'optimiser le milieu de culture à

l'aide de NH_4^+. En ce qui concerne les acides aminés, plusieurs recherches ont prouvé que certains d'entre eux encourageaient la croissance, la sporulation et la formation des cristaux protéiques (arginine, acide aspartique, cystine, glycine, proline, asparagine, méthionine et glutamine), tandis que d'autres les inhibaient (histidine, thréonine, tyrosine, valine, isoleucine, leucine, sérine et lysine) (Abdel-Hameed, 1992). Les travaux de Yang et Wang (1998) ont permis d'établir que l'épuisement de la source d'azote initiait la sporulation.

La source de carbone a été beaucoup plus étudiée que la source d'azote, en particulier le glucose qui demeure la source de carbone la plus utilisée. L'amidon, la mélasse, le dextrose, la farine et le glycérol sont quelques-unes des sources de carbone pouvant être employées. Par contre, on obtient de meilleurs résultats de croissance en utilisant les sources de carbone les plus simples. La concentration de carbone peut avoir une grande influence sur la taille et la morphologie des cristaux produits par Bt. L'addition de glucose à un milieu simple influence avantageusement le volume des cristaux et un taux maximal de production de cristaux est atteint à des concentrations de glucose de 8g/l (Scherrer *et al.*, 1973). Par contre, une quantité excessive de carbohydrates (> 40g/l) dans le milieu peut entraîner une chute importante du pH, qui provoquera ainsi l'arrêt de la croissance (Yang et Wang, 1998).

1.1.4 Demande en oxygène dissous

La formation des spores et la synthèse des δ-endotoxines dépendent de la disponibilité de l'oxygène dans le milieu (Bernhard et Utz, 1993). La croissance et le taux de respiration des cellules de Bt sont affectés par la concentration d'oxygène dissous lors de la fermentation (Vidyarthi *et al*, 2002). Si la quantité d'oxygène n'est pas suffisante, on obtient moins de spores et d'entomotoxines. Cette valeur est propre à chaque souche bactérienne. Avignone-Rossa et Mignone (1992) ont démontré que le taux de respiration (consommation d'oxygène et production de dioxyde de carbone) atteint son maximum durant la phase exponentielle. Ils ont également mis en évidence que la croissance de Bt et la production de spores étaient optimales lorsque les conditions d'oxygène n'étaient pas limitantes. Le taux de croissance spécifique maximal (μ_{max}) est directement

proportionnel au taux de respiration maximal, indiquant qu'une aération élevée durant la phase exponentielle est souhaitable (Avignone-Rossa et Mignone, 1992).

La quantité de solides présents dans le milieu peut également affecter le transfert de l'oxygène. L'ajout d'agents surfactants au milieu de culture permet alors de diminuer la sédimentation de la matière en suspension et améliore ainsi le transfert d'oxygène (Zouari et Jaoura, 1999; Vidyarthi *et al*, 2002).

1.2 PRODUCTION DE BIOPESTICIDES

Les biopesticides sont des préparations utilisées dans le contrôle biologique des insectes ou des plantes nuisibles, ainsi que les organismes phytopathogènes et dans lesquelles l'ingrédient actif est un micro-organisme vivant ou un produit dérivé des micro-organismes. Les biopesticides regroupent des micro-organismes pouvant être des bactéries, des virus, des mycètes ou des parasites. Les préparations peuvent servir d'insecticides, herbicides, fongicides ou pour la prévention de maladies végétales. Le marché des biopesticides est évalué à 350 millions US$ et représentent 1% des ventes globales des pesticides. La faible utilisation des biopesticides peut s'expliquer par l'inconsistance des résultats sur le terrain, la durée d'entreposage très courte, le coût élevé par rapport aux formulations chimiques et le nombre limité de pestes visées (Copping et Menn, 2000). Les avantages reliés à l'utilisation de biopesticides devraient, par contre, en favoriser le développement commercial ; ils sont biodégradables, très spécifiques aux pestes et sont sans danger pour les plantes, les animaux et les humains.

1.2.1 Les entomotoxines de Bt

De tous les micro-organismes pouvant servir de biopesticides, *Bacillus thuringiensis* (Bt) a été celui qui a été le plus étudié. Les suspensions à base de Bt sont les plus populaires et occupent 95% du marché des bioinsecticides et presque 4,5% du marché mondial des insecticides (Hall et Menn, 1998). Les produits à base de Bt sont les pesticides microbiologiques parmi les plus efficaces parce qu'ils présentent des caractéristiques particulières; leur action est spécifique et leur structure moléculaires sont

biodégradables. Cette bactérie est caractérisée par la production d'endotoxines durant la phase de sporulation qui agissent comme agent actif contre l'insecte visé. Ces endotoxines sont insolubles au pH ambiant. La production de Bt à grande échelle est rentable et ce bioinsecticide est utilisé dans plusieurs pays. Beaucoup d'efforts ont été déployés afin d'améliorer la performance du produit, entre autres, grâce aux technologies d'ADN recombinant.

Parmi les molécules d'intérêt pour la production de Bt et synthétisées par cette dernière, on note des toxines, des protéases, des lécithinases et des nucléases. Parmi les toxines, se retrouvent l'α-exotoxine, la β-exotoxine et la δ-endotoxine. Les deux premières peuvent être toxiques pour plusieurs types de cellules, alors que la dernière est très spécifique. Les δ-endotoxines représentent le groupe le plus important des toxines de Bt et leur forme, composition et nombre varient selon les sous-espèces de Bt (Whiteley et Schnepf, 1986).

1.2.2 Structure des entomotoxines

Le pouvoir insecticide de Bt provient de séquences protéiques contenues dans les inclusions cristallines parasporales (Holt et Krieg, 1984-1989). Plus de 69 sérotypes de Bt sont connus. Ils ont tous été identifiés par les caractéristiques de leurs antigènes flagellaires. La présence du cristal parasporal à proximité du spore est un des critères qui permet de différencier Bt des autres espèces similaires, telles que *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis* (Andrews *et al*, 1987). La classification basée sur les gènes codant les cristaux protéiques regroupe les endotoxines selon leurs propriétés insecticides et des liens moléculaires (Höfte et Whiteley, 1989). On retrouve les gènes codant les cristaux protéiques (*cry*) chez Bt dans les plasmides de poids moléculaire compris entre 1.5 à 180 Mda, chaque bactérie pouvant contenir de 2 à 17 plasmides. Les gènes des cristaux sont transcrits par une ARN polymérase spécifique à la sporulation (Gonzalez *et al*, 1981). Plus de 25 différentes classes de gènes *cry* ont été identifiés jusqu'à maintenant. Les gènes *cry* et les protéines cristallines sont divisés en cinq groupes (Tableau 1) qui diffèrent dans leur activité insecticide, la taille de la protéine cristalline et la séquence des gènes (Copping et Menn, 2000).

Tableau 1 : Gènes *cry* de Bt (Copping et Menn, 2000)

Gènes	Insectes ciblés (ordre)
cry I	Lépidoptères
cry II	Lépidoptères
cry III	Coléoptères
cry IV	Diptères
cry V	Lépidoptères et coléoptères

On retrouve sur le marché plusieurs préparations insecticides regroupant principalement quatre sous-espèces de Bt. Bt var. *kurstaki* est de loin la plus utilisée et occupe environ 85% du marché relié à Bt. Elle est utilisée pour contrôler les populations de la fausse-teigne des crucifères en Amérique du Nord, alors qu'au Canada, elle est utilisée pour le contrôle des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Bt var. *israelensis* est utilisée pour réprimer les moustiques et les mouches noires, alors que Bt var. *tenebronis* permet de contrôler le doryphore de la pomme de terre. Finalement, Bt var. *aizawai* est utilisée pour contrôler les lépidoptères dans de plus petits marchés, souvent résistants à Bt var. *kurstaki* (Lisansky, 1996).

Il existe un lien entre la forme des cristaux parasporaux et leur activité insecticide. Les cristaux toxiques pour les lépidoptères possèdent une forme bipyramidale ou en forme de diamant (Figure 2). Les cristaux toxiques pour les diptères sont plutôt pléomorphiques, alors que ceux utilisés contre les coléoptères sont rectangulaires et plats. Les trois types de cristaux partagent tout de même des propriétés similaires. Ce sont des protéines de tailles semblables. La complexité structurelle des différents cristaux prouve du fait qu'ils contiennent plus d'une sorte de protéine (Höfte et Whiteley, 1989). L'assemblage et le maintien du complexe de protéines dans le corps d'inclusion se font grâce aux liens hydrogène et disulfure (Aronson *et al.* 1986).

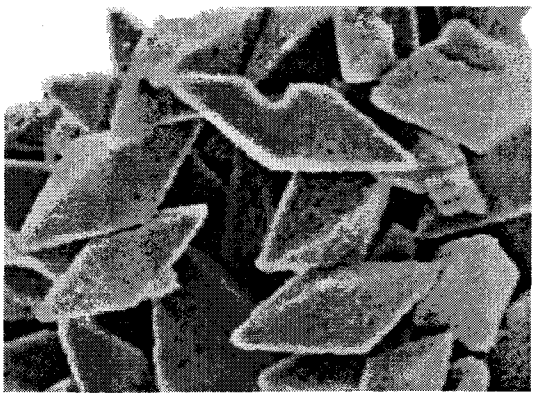


Figure 2 : Protéines cristallines de Bt

Les cristaux protéiques sont produits durant la sporulation, généralement à la fin de la phase exponentielle de croissance lorsque les sources d'azote et de carbone sont épuisées dans le milieu. La formation des spores s'effectue en sept étapes et la synthèse des cristaux est initiée au deuxième ou troisième stade de la sporulation (Andrews *et al.*, 1987). Le corps d'inclusion atteint sa forme finale au cinquième stade et le cristal protéique est libéré à la mort de la cellule (Bulla *et al.* 1980).

1.2.3 Entomotoxicité

Les protéines cristallines sont des glycoprotéines d'un poids moléculaire compris entre 130 à 160 kDa. Elles sont toxiques en fragments de 30 à 80 kDa (Aronson *et al.*, 1986; Whiteley et Schepf, 1986). Après ingestion par une larve d'insecte, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin et sont hydrolysés par les protéases présentes dans l'intestin de l'insecte (Cooper, 1994; Oppert, 1999). Les fragments entrent alors en contact avec les récepteurs présents dans les membranes des cellules épithéliales et forment des petits pores. La perméabilité des cellules est alors altérée, perturbant ainsi l'équilibre osmotique. Les bactéries normalement présentes dans l'intestin et les spores de Bt peuvent alors pénétrer dans les cavités, ce qui entraîne la paralysie complète du système intestinal de l'insecte qui ne peut plus se nourrir et meurt de septicémie (Cooper, 1994). Il est également à noter qu'un mélange de spores et cristaux est de 4 à 5 fois plus pathogène qu'une préparation ne contenant que des cristaux (Valéro *et al*, 1993). Les mécanismes de résistance des insectes par rapport à Bt sont surtout reliés au mauvais fonctionnement des protéases de l'hôte, les toxines devenant actives qu'une fois

protéolysées (Oppert *et al*, 1997). Notons, cependant, que certaines études démontrent maintenant que les protéases de Bt pourraient également avoir un rôle à jouer dans le processus d'activation de la toxine (Kumar et Venkateswerlu, 1998a).

Certains facteurs peuvent expliquer le caractère spécifique de l'action de Bt sur les insectes nuisibles; la structure du cristal protéique, les différences de pH au niveau de l'intestin des larves affectant la solubilisation ou l'efficacité de la toxine, ainsi que la présence de sites spécifiques de liaison pour la toxine sur l'épithélium intestinal de la larve.

1.3 PRODUCTION DES PROTÉASES

1.3.1 Structure moléculaire et mécanisme de protéolyse

Les enzymes sont des protéines de très hauts poids moléculaires (10 000 à 1 000 000 Daltons) et sont constituées de longues chaînes d'acides aminés retenues ensembles par des liens peptidiques. Les enzymes sont des catalyseurs biochimiques qui accomplissent une multitude de réactions chimiques et qui peuvent être utilisées dans plusieurs procédés industriels (Kumar et Takagi, 1999).

Les enzymes contribuent à la protection de l'environnement de deux façons : elles remplacent les produits chimiques dans divers procédés industriels et elles permettent de réduire la consommation d'énergie. En effet, elles ne nécessitent pas des températures élevées pour être actives et n'obligent pas à utiliser de l'équipement dispendieux résistant à la chaleur, à la pression et à l'oxydation. Deux caractéristiques des enzymes les rendent très intéressantes : elles sont plus spécifiques que les acides, bases, métaux, oxydes de métaux ou autres catalyseurs inorganiques et n'ont pas d'impact sur les autres réactions chimiques dans les procédés. De plus, elles peuvent être réutilisées, contrairement à la majorité des produits chimiques qui ne sont pas régénérés après la réaction catalytique (Kumar et Takagi, 1999). Au moins 75% des enzymes utilisées pour remplacer les produits chimiques et améliorer la performance des procédés industriels de type hydrolytique. Les trois principaux groupes sont les carbohydrases, les protéases et les

lipases. Les micro-organismes sont la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent de champignons et des levure, 35% des bactéries et 15% d'origine végétale.

Le marché des enzymes s'élève à plus de 1.6 milliards US$ par années et les protéases occupe environ 60% des ventes mondiales des enzymes (Demain, 2000; Rao *et al*, 1998). Les protéases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines en brisant les liens peptidiques. Elles sont réparties en deux classes : les endopeptidases qui scindent les liens peptides des protéines et transforment les grandes chaînes de polypeptides en plus petits fragments; et les exopeptidases qui attaquent le lien peptidique près d'un groupe carboxyle libre –COOH (carboxypeptidases) ou près d'un groupe aminé libre $-NH_2$ (aminopeptidases). L'action combinée des endopeptidases et des exopeptidases transforme les protéines en acides aminés.

1.3.2 Types de protéases

Les protéases microbiennes occupent 40% des ventes totales d'enzymes et sont préférées aux autres protéases parce qu'elles possèdent les caractéristiques nécessaires aux applications biotechnologiques (Rao *et al*, 1998). Elles peuvent être d'origine bactérienne (*Bacillus subtilis*, *Bacillus lichenformis*, ets.), fongique (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, etc.) ou virale. Elles sont classées en quatre groupes (Rao *et al*, 1998) : les protéases acides ou aspartiques , les protéases alcalines ou sérines, les protéases neutres ou métalloprotéases et les protéases cystéiques ou thiol

Les protéases alcalines sont produites par plusieurs espèces microbiennes, telles que *Streptomyces*, *Arthobacter* et *Flavobacterium*. Les protéases alcalines produites par différentes espèces de *Bacillus*, les subtilisines, sont celles les plus commercialisées et représentent les protéases les plus importantes industriellement. Ces endopeptidases sont caractérisées par la présence d'un groupe sérine au niveau de leur site actif et possèdent un pH optimal près de 11 (Rao *et al*, 1998). Ces protéases sont les plus importantes en industrie et en environnement. Elles sont surtout utilisées dans les détergents, dans le domaine alimentaire, en tannerie, dans le traitement des eaux usées et dans les industries pharmaceutiques et chimiques (Rao, 1998; Kumar et Takagi, 1999; Gupta *et al*. 2002a).

Les protéases alcalines microbiennes ont largement été étudiées et leurs propriétés sont bien connues. Elles sont thermostables et sont actives à des pH allant de 8 à 12. Nous savons également de l'ion Ca^{2+} permet de stabiliser les protéases alcalines soumises à des températures élevées (Lee *et al*, 1996 ; Kumar, 2002). Les ions métalliques protègent les protéases alcalines contre la dénaturation et jouent un rôle majeur dans le maintien de la conformation active de l'enzyme à de hautes températures. On connaît également des substances inhibitrices de l'activité protéolytiques. L'EDTA (éthylèndiaminetetraacétate) agit spécifiquement sur les protéases neutres en enlevant l'ion métallique présent au site actif. Le PMSM (fluorure de phénylméthylsulphonyl) interagit, quant à lui, avec le groupement sérine du site actif des protéases alcalines, par phosphorylation ou fluorisation (Bibilos et Andrews, 1988).

L'activité protéolytique peut être mesurée par des méthodes qualitatives et quantitatives. On mesure généralement les produits de l'hydrolyse des protéines ou la protéine résiduelle elle-même. Les méthodes qualitatives reposent sur l'analyse de la formation d'une zone claire de protéolyse sur les géloses d'agar et qui est le résultat d'une production de protéases. En ce qui concerne les méthodes quantitatives, elles servent à mesurer le potentiel protéolytique d'une enzyme en dosant la quantité de peptide libérée lors de l'hydrolyse d'une protéine. La mesure peut se faire par spectrophotométrie, fluorométrie, radiométrie ou avec la méthode d'ELISA (Gupta *et al*, 2002b).

1.3.3 Activité protéolytique chez Bt

Toutes les bactéries doivent produire des protéases. En effet, celles-ci permettent de dégrader les protéines existantes afin de fournir des acides aminés nécessaires à la synthèse d'autres protéines. Par contre, seulement quelques micro-organismes arrivent à produire suffisamment de protéases pour être commercialement intéressants. Les protéases produites par Bt sont thermostables et sont en grande partie des métalloprotéases. On retrouve en moins grande quantité des protéases alcalines et cystéiques. Par contre, la proportion des classes de protéases varie d'une sous-espèce à l'autre. En effet, les sous-espèces de Bt *tenebrionis* et *kurstaki* produisent en majorité des

métalloprotéases. Les protéases produites par Bt var. *israelensis* sont de nature alcaline dans une proportion de 50% des protéases totales (Reddy *et al.*, 1998).

Chez les différentes espèces de *Bacillus*, la production des protéases extracellulaires survient après la phase exponentielle et durant la phase stationnaire. Les conditions de culture influencent grandement la production des protéases, au même titre que les cristaux protéiques. La production de protéases peut être inhibée par certaines sources de carbone ou d'azote, mais est activée lorsque les conditions du milieu deviennent limitantes (Secades et Guijarro, 1999). Elle est particulièrement affectée par la présence de sources d'azote rapidement utilisables, comme les acides aminés. D'autres facteurs physiques peuvent influencer la production des protéases (pH, température, aération et volume d'inoculum) (Hameed *et al*, 1999). La régulation de l'activité hydrolytique se fait donc à différents niveaux et dépend de la composition du milieu.

La synthèse des protéases est intimement reliée à la sporulation chez toutes les espèces de *Bacillus* (Zouari et Jaoua, 1999). En effet, la dégradation des protéines préexistantes permet de fournir les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines essentielles à la formation du spore (Doi, 1972; Reddy *et al*, 1998). Les mécanismes et les facteurs agissant sur la sporulation influenceront également la synthèse des protéases.

Les protéases produites par Bt font l'objet d'un nombre important de recherches depuis quelques années, puisque plusieurs études ont prouvé que les protéases produites par Bt pouvaient hydrolyser les cristaux protéiques (Chestukhina *et al.*, 1980; Andrews *et al.*, 1985; Bibilos et Andrews, 1988; Carroll *et al.*, 1993, Donovan *et al.*, 1997; Meenakshisundaresh et Gujar, 1998). Bibilos et Andrews ont démontré que les trois sortes de protéases intervenaient dans le processus de la transformation de la protoxine en toxine active. Lors de ses travaux, Carroll *et al.* (1989) a démontré que la réduction de la taille des cristaux protéiques avait lieu durant la sporulation et que la protéolyse pouvait être stoppée par l'ajout d'inhibiteurs. Une augmentation de l'activité enzymatique peut également influencer la toxicité des cristaux protéiques. En effet, les souches de Bt ayant une activité protéolytique moindre présentaient une quantité moins élevée de toxines de poids moléculaire 68 000, c'est-à-dire la forme active du cristal protéique (Bibilos et

Andrews, 1988). L'hydrolyse des cristaux induit des changements dans leur structure, induisant ainsi des modifications de propriétés. Les travaux de Kumar et Venkateswerlu (1998a) ont démontré que les cristaux de Bt var. *kurstaki* étaient hydrolysés par les métalloprotéases produites par le microorganisme, lorsque les conditions étaient réductrices et dénaturantes. Sous ses conditions, la toxine produite devenait active contre les larves de *Spodoptera littoralis*, cette dernière étant normalement insensible aux solutions de Bt var. *kurstaki*. Aussi, Zouari *et al.*(2002) ont démontré qu'une activité enzymatique très élevée chez Bt résultait en une entomotoxicité plus faible, attribuable à la dégradation du cristal protéolytique par les protéases.

1.4 LES TRAVAUX DU GROUPE DE RECHERCHE EN ASSAINISSEMENT DE L'INRS-ETE

Diverses biotechnologies environnementales peuvent être appliquées grâce aux caractéristiques des boues. Le Groupe de Recherche en Assainissement de l'INRS-ETE a étudié plusieurs possibilités durant les dernières années. Les principaux travaux portent sur la production de biopesticides, de biofertilisants, de bioplastiques et d'enzymes protéolytiques à partir de biosolides. Plusieurs stratégies ont été mises au point pour améliorer les procédés existants.

1.4.1 Biopesticides

Plusieurs stratégies ont été développées afin d'optimiser l'entomotoxicité chez Bt. Les travaux de Sachdeva *et al.* (1999 et 2000) portaient sur la concentration de solides dans les boues et la taille de l'inoculum optimum. Les fermentations avec 1% d'inoculum donnaient des comptes de cellules viables et de spores plus élevés que les cultures avec 5% d'inoculum. Les auteurs ont également démontré que des concentrations plus faibles de solides (2.5%) permettaient d'obtenir une entomotoxicité plus élevée par rapport à des concentrations de solides plus élevées (3.5 et 4.0%). Des concentrations en solides plus faibles offrent une meilleure mobilité pour la bactérie et un meilleur transfert d'O_2 en raison des faibles viscosité.

Les travaux de Lachhab *et al.* (2001) ont permis de définir encore mieux les conditions optimales pour la croissance de Bt. En effet, ils ont démontré que les meilleurs résultats de comptes de cellules viables étaient obtenus avec un volume d'inoculum de 2% (2.2×10^9 UFC/ml) et 3% (3.6×10^9 UFC/ml). Un volume d'inoculum de 2% permettaient d'obtenir l'entomotoxicité la plus élevée (12 900 UI/µl). L'étude a également démontrée que la concentration de solides totaux optimale était de 26 g/l, avec une entomotoxicité de 12 970 UI/µl, un compte de cellules viables et de spores de 5.0×10^9 UFC/ml et de 4.8×10^9 UFC/ml respectivement.

Le transfert de l'oxygène peut être amélioré grâce à l'ajout d'agents surfactants au milieu de culture. Les travaux de Vidyarthi *et al.* (2001) ont démontré qu'en additionnant des surfactants tels que ATLOX 847, ATPLUS 522, TWEEN 85, on pouvait stimuler la croissance et le potentiel entomotoxique de Bt. Vidyarthi *et al.* (2002) ont également étudié les effets de la composition et de la nature des biosolides sur l'entomotoxicité et le nombre de cellules et de spores viables. Ces travaux ont démontré que l'utilisation de boues d'épuration mixtes permettait d'obtenir une meilleure entomotoxicité (10111 UI/µl) par rapport aux boues d'épuration secondaires (8839 UI/µl). De plus, cette étude a également prouvé qu'une concentration en solides totaux de 25 g/l permettait d'obtenir les meilleurs résultats d'entomotoxicité et de comptes de cellules et de spores viables.

Il est également possible d'améliorer la production d'entomotoxines grâce à un pré-traitement des biosolides. Les traitements ont pour but de rendre plus disponibles les nutriments présents dans les boues. Les travaux de Barnabé (2000) ont permis de déterminer que l'hydrolyse thermique alcaline permettait d'obtenir le potentiel toxique le plus élevé. Ce pré-traitement est réalisé en micro-ondes, sans agitation du milieu de culture. Cette étude a également portée sur l'impact des chocs de pH. Cette approche influence la disponibilité des éléments nécessaires à la formation de spores et des δ-endotoxines en agissant au niveau des transferts membranaires. Ainsi, l'entomotoxicité peut être rehaussée de 14 à 26% selon les temps et le nombre des chocs. Les travaux de Tirado Montiel *et al.* (2001) consistaient à appliquer différents traitements aux boues afin d'en étudier l'impact sur la croissance de Bt. Les résultats obtenus démontraient qu'une hydrolyse acide des boues d'épuration permettait d'obtenir plus de cellules et une

meilleure sporulation. L'entomotoxicité était également plus élevée (4100 UI/µl) par rapport au milieu soya (3800 UI/µl) . Le surnageant des boues hydrolysées permettait de supporter la croissance de Bt, mais les résultats obtenus étaient inférieurs à ceux des boues hydrolysées ou non-hydrolysées.

1.4.2 Biofertilisants et bioplastiques

La possibilité de produire des biofertilisants à l'aide des boues d'épuration a aussi été étudiée. Les travaux de Ben Rebah *et al.* (2001) ont permis d'étudier l'effet du traitement des boues sur la croissance de *Sinorhizobium meliloti*, une bactérie vivant en symbiose avec les plantes en leur permettant de fixer l'azote. De bons résultats avec les boues primaires et secondaires étaient obtenus après hydrolyse acide ou alcaline des boues d'épuration. Les travaux de 2002 ont porté sur l'ajout de nutriments et le contrôle du pH et leurs effets sur la croissance de *S. meliloti*. L'addition de 4 g/l d'extrait de levure donnait un maximum de 8.85×10^9 UFC/ml après 32 heures d'incubation, ce qui représente un résultat 3.2 fois supérieur à celui obtenu avec des boues non-additionnées d'extrait de levure. En ce qui concerne le pH, l'étude a démontré que celui-ci influençait peu la croissance de la bactérie. En effet, une augmentation du pH jusqu'à 8.85 en bioréacteur n'avait pas d'effet sur la croissance. Ben Rebah *et al.* (2003) ont également utilisé Bt et différents rhizobia pour la production d'un bioplastique, le polyhydroxybutyrate (PHB). Les résultats démontrent que ces bactéries accumulent le PHB lorsqu'elles sont cultivées dans les boues d'épuration.

1.4.3 Enzymes protéolytiques

La production de protéases microbiennes à partir de boues d'épuration a également été étudiée. Meunier (1999) a utilisé plusieurs souches de *B. licheniformis*, une bactérie capable de produire d'importantes quantités de protéases alcalines. Cette étude a permis de démontrer que la croissance microbienne optimale était obtenue avec un contenu en solides totaux de 20 g/l. Ces travaux ont également démontré qu'un apport externe d'azote ammoniacal inhibe la production des protéases, alors qu'une addition d'une source protéique (farine de soya) aux boues n'influence pas significativement la

production d'enzymes protéolytiques. Dans la même lignée, les travaux de Tyagi *et al.* ont porté sur la production simultanée d'entomotoxines et de protéases alcalines par Bt var. *kurstaki* HD-1, à partir des boues d'épuration. Les résultats de comptes de cellules viables et de spores étaient supérieurs en milieu soya, mais l'entomotoxicité et l'activité protéolytique étaient plus élevées dans les boues d'épuration (9332 UI/µl et 4.58 UI/ml, respectivement). Les protéases produites par Bt ont également été caractérisées. Deux types de protéases ont été détectées : des protéases neutres et alcalines. Aussi, la thermostabilité des protéases augmentait après ajout de $CaCl_2$, indiquant ainsi la présence de métalloprotéases.

Les travaux de Mohammedi (2003) ont permis de tester plusieurs souches de Bt issues de boues d'épuration présentant un potentiel entomotoxique intéressant dans les boues d'épuration, d'environ 14 000 UI/µl. L'activité protéolytique des ces souches a également été mesurée et les résultats obtenus étaient relativement faibles (moins de 2 UI/ml), même en conditions contrôlées dans le bioréacteur. Toutes les souches présentaient une bonne croissance dans les boues d'épuration secondaires.

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif principal de cette étude est la caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* isolées de boues d'épuration. Nous pouvons toutefois nous attendre à certains résultats, résumés ici dans les hypothèses de recherche.

2.1 Hypothèses de recherche

1. La revue de littérature nous a permis d'établir que les souches de *Bacillus thuringiensis* (Bt) offraient une bonne croissance et une entomotoxicité intéressante dans les boues d'épuration d'origine municipale. Nous pouvont ainsi nous attendre à des résultats aussi intéressants avec les souches de Bt isolées des boues d'épuration, puisque les biosolides possèdent tous les nutriments essentiels à la croissance de Bt;
2. Il a également été prouvé que Bt produisait suffisamment d'enzymes protéolytiques pour présenter un potentiel commercial. Il est donc probable que les nouvelles souches de Bt présentent une activité protéolytique intéressante;
3. Plusieurs articles ont permis de prouver que la majorité des protéases produites par Bt étaient neutres. Nous pouvons donc nous attendre à déceler, en grande partie, la présence de protéases ayant un pH optimal autour de la neutralité. Par contre, d'après la littérature, nous devrions également détecter un pic d'activité protéolytique à des pH de 9 à 11;
4. Nous savons qu'il est possible de produire simultanément des toxines de Bt et des protéases dans un substrat de fermentation complexe comme les boues municipales. Nous estimons que la production de protéases ne devrait pas interférer avec la production d'entomotoxines par Bt;
5. Les souches de Bt ont été isolées de biosolides et devraient donner d'excellents résultats lorsque cultivées dans ce milieu de culture. Les souches Bt4, 6, 8, 12, 14 et a ont fait l'objet de travaux par Mohammedi (2001). Celles-ci donnaient de bons résultats d'entomotoxicité, mais l'activité enzymatique était faible, dû à la difficulté à contrôler le pH en fioles. L'emploi de bioréacteurs pour les expériences devrait régler ce problème et permettre ainsi d'augmenter

l'entomotoxicité en conditions contrôlées. Les souches Bt21 et 24 font également partie de cette étude.

2.2 Objectifs spécifiques de recherche

Le présent projet de recherche a pour but principal de tester plusieurs souches de Bt cultivables dans le milieu synthétique et les boues d'épuration, afin de déterminer l'importance de la production simultanée de toxines et de protéases. Ces souches ont été isolées de boues d'épuration. Les objectifs spécifiques de recherche sont les suivants :

- Déterminer l'activité protéolytique des meilleures souches isolées des boues;
  - dans le milieu synthétique;
  - dans les boues d'épuration;
- Caractériser les protéases afin de s'assurer de leur nature alcalines;
- Vérification du potentiel entomotoxique de chaque souche par rapport à la souche de référence *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*;
- Trouver une corrélation entre K_La et les différentes caractéristiques de chacune des souches.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Souches de bactéries

Les souches de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilisées dans cette étude ont été isolées de boues d'épuration de l'usine d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec et de larves d'insectes (Mohammedi, 2001). Des numéros et des lettres ont été attribués à ces souches. Celles-ci présentaient des inclusions parasporales et ont ainsi été identifiées comme des souches de Bt. Ces souches ont ensuite été caractérisées par PCR afin d'en identifier les gènes *cry*. Toutes les souches sont toxiques pour les larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette. Les souches sélectionnées pour cette étude sont celles ayant démontré les meilleurs résultats dans les expériences précédentes : Bt4, Bt6, Bt8, Bt12, Bt14, Bt21, Bt24 et Bta.

Bt var. *kurstaki* HD-1 ou Btk (ATCC 33679) a également été utilisé dans cette étude. Chaque souche a été cultivée et repiquée sur une géloses d'agar tryptique soya [TSA : 3.0% Bouillon Tryptique Soya (Difco, USA) + 1.5% Bacto-Agar (Difco)], avant d'être incubée 24 heures à 30 ± 1°C. Elles sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

3.2 Échantillons de biosolides

Les boues d'épuration secondaires de l'usine d'épuration de la Communauté Urbaine de Québec (CUQ) ont été employées dans ce projet. Elles ont été prélevées le 17 mai (Bt4, 6, 8, 12 et 21), le 10 septembre (Bt14 et Bta) et le 23 septembre (Bt24 et Btk) de l'année 2002. Les boues sont décantées afin d'en augmenter la concentration en matières en suspension (MES) à 25 g/l. Cette concentration optimale utilisée permet d'obtenir un maximum de sporulation et d'entomotoxicité (Lachhab *et al.*; Vidyarthi *et al.*, 2002). Les biosolides sont ensuite stérilisés à 121°C pendant 30 minutes et sont entreposés à 4°C jusqu'à leur utilisation. La stérilisation prévient la détérioration des boues pendant leur entreposage. L'analyse des caractéristiques physico-chimiques des boues est faite en suivant une méthode standard (APHA, 1989). Pour chaque expérience, les boues sont re-stérilisées à 121°C pendant 30 minutes et le pH est ajusté à 6.9 ±0.1 avec des solutions de

NaOH 2N et H_2SO_4 2N après la stérilisation. Le Tableau 2 présente un résumé des caractéristiques des boues d'épuration utilisées pour l'ensemble des essais expérimentaux.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des boues d'épuration de la CUQ

	17 mai 02	10 septembre 02	23 septembre 02	Moyenne
Paramètres physiques				
Solides totaux (g/l)	20	20	19	19.7
Solides volatiles (g/l)	10	9	9	9.3
Matières en suspension (g/l)	15	15	14	14.7
pH	5.9	5.7	5.8	5.8
Paramètres chimiques				
C (w/w %)	27	32	30	29.7
N (w/w %)	6	9	8	8
N-NH3 (mg/kg)	657	712	582	650
N-NO2+NO3 (mg/kg)	8	24	7	13
P-total (mg/kg)	13600	12500	14000	13367
P-total inorg. (mg/kg)	6630	7310	7840	7260
Métaux (mg/kg)				
Aluminium	15500	16000	17600	16366.7
Calcium	20700	18300	17000	18667
Cadmium	3	3	5	4
Chrome	83	51	57	64
Cuivre	267	245	267	260
Fer	10500	13900	11200	11866.7
Potassium	2367	1650	2760	2259
Plomb	69	73	65	69
Zinc	581	513	630	575

3.3 Milieu synthétique

Le milieu synthétique utilisé est un milieu commercial à base de soya contenant (g/l) : farine de soya, 15.0; dextrose, 5.0; amidon, 5.0; K_2HPO_4, 1.0; KH_2PO_4, 1.0; $MgSO_4.7H_2O$, 0.3; $FeSO_4.7H_2O$, 0.02; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.02; $CaCO_3$, 1.0. Le pH du milieu soya est ajusté à 6.9 ±0.1 avec des solutions de NaOH 1N et H_2SO_4 1N avant la stérilisation. La stérilisation est effectuée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Le

glucose et le $MgSO_4$ doivent être stérilisés à part et être incorporés au milieu aseptiquement.

3.4 Inoculum et conditions de culture

Une colonie de bactérie est prélevée sur les géloses de TSA pour inoculer une fiole Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de bouillon tryptique soya (TSB : 3.0% de bouillon tryptique soya (Difco)). Avant l'inoculation, le bouillon est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. La fiole est placée dans un incubateur-agitateur à 300 rpm et à 30°C pendant 12 heures. On inocule ensuite une fiole contenant 100 ml de boues ou de milieu soya stériles avec 2ml du bouillon TSB (2% v/v). La fiole sera incubée dans les mêmes conditions pendant 12 heures. Le volume de l'inoculum est optimal pour la croissance de Bt (Lachhab *et al.*, 2001) Cette fiole servira à inoculer le fermenteur de 15 litres.

3.5 Expériences en fermenteur

Les fermenteurs de 15 litres, équipés de sondes à pH et à oxygène, peuvent contenir 10 L de boues d'épuration ou de milieu synthétique, stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. 10 ml de glycol polypropylène (PPG) est ajouté dans le milieu avant la stérilisation afin de minimiser la formation de mousse durant la stérilisation. 200 ml d'inoculum (2%v/v) est ajouté dans chaque fermenteur. Une aération suffisante et une agitation appropriée sont maintenues afin d'assurer un apport d'oxygène satisfaisant au milieu. Un programme informatique (Fix intellect) est utilisé pour contrôler divers paramètres : température, pH, débit d'oxygène, agitation, concentration d'oxygène dissous et quantité de mousse. Ce programme permet d'enregistrer ces paramètres en plus de la consommation des solutions acides et alcalines et d'anti-mousse durant la fermentation. Le pH et la température sont maintenu à 6.9±0.1 et 30°C, respectivement. Le pH est maintenu durant la fermentation à l'aide de solutions de NaOH 2N et H_2SO_4 2N, injectées grâce à des pompes péristaltiques contrôlées via le programme informatique. La formation de mousse durant la fermentation est contrôlée grâce à un agent anti-mousse chimique et à un briseur de mousse mécanique. Une émulsion aqueuse de PPG 1 :10 constitue l'agent chimique.

La sonde pour le pH (Metler toldeo) est calibrée en utilisant des solutions tampons standards à pH 4.0 et 7.0 (VWR-Canada) avant la stérilisation. La sonde à oxygène dissous est remise à zéro dans une solution de sulfite de sodium 1N avant la stérilisation. Elle est calibrée à 100% dans une solution d'eau distillée. Avant l'inoculation, la sonde est recalibrée à zéro avec du gaz N_2 et à 100% grâce à l'apport d'oxygène dans le milieu.

Des échantillons sont prélevés aseptiquement à différents intervalles, afin d'analyser les comptes de cellules et de spores viables, l'activité protéolytique et l'entomotoxicité.

3.6 Analyse des échantillons

Les échantillons prélevés sont analysés pour le décompte des cellules et des spores viables par le nombre d'unités formant des colonies (UFC) par étalement sur gélose TSA. Les dilutions appropriées sont étalées sur gélose grâce à un râteau et les pétris sont ensuite incubés 24 heures à 30°C afin de permettre aux colonies de bien se développer. Pour le compte de spores, la dilution appropriée de l'échantillon est soumise à un traitement à la chaleur de 75°C pendant 15 minutes avant d'être étalée.

3.7 Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité enzymatique se fait selon la méthode d'hydrolyse de la caséine établie par Kunitz (1938). Les échantillons sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est dilué dans une solution tampon borate à pH 8.2 afin de maintenir les conditions alcalines lors de la réalisation du test enzymatique (les préparations des tampons se trouvent à l'Annexe A). L'activité protéolytique est mesurée à l'aide de la méthode d'Anson (1938) utilisant la caséine (Sigma-Aldrich, Canada Inc) comme substrat. Cinq ml de caséine (1.2% dans le tampon borate pH 8.2) est incubée avec 1 ml de la solution enzymatique proprement diluée durant 10 minutes à 37°C dans un bain maintenant la température de l'eau et une faible agitation constantes. La caséine n'ayant pas été hydrolysée est précipitée grâce à l'ajout de 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) (18g d'acide trichloroacétique, 29,94g d'acétate de sodium, 18,8ml d'acide

acétique et 981,2ml d'eau distillée) et l'incubation se poursuit à la même température pour encore 30 minutes, afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non-hydrolysée. Pour chaque échantillon, on prépare un blanc avec de la caséine inactivée. Cinq ml de caséine est tout d'abord précipitée avec 5 ml de TCA pendant 10 minutes à 37°C avant l'ajout de 1 ml de la solution enzymatique. Après la période d'incubation de 30 minutes, les échantillons et les solutions de blancs sont centrifugés à 12000 rpm pour 15 minutes ou filtrés sur papiers Whatman 934-AH. L'absorbance est ensuite mesurée à 275 nm. La validation des résultats s'établit par comparaison à l'activité connue d'une solution enzymatique standard, selon les mêmes conditions. **Une unité internationale d'enzyme hydrolyse la caséine pour produire la coloration équivalente à 1.0 µmole (181,0 µg) de tyrosine par minute à pH 8.2 et à 37°C.**

La tyrosine utilisée pour créer la courbe l'étalonnage provient de la compagnie Sigma, porte le numéro de référence T 3754 et est certifiée L-tyrosine pure à 98%. Les courbes d'étalonnage de tyrosine sont préparées à partir de solutions de tyrosine comprises entre 0 et 181,0 mg de tyrosine (1,0 mM). La tyrosine est diluée dans une solution composée de 50% de tampon borate et 50% de la solution d'acide trichloroacétique. La lecture des résultats se fait grâce à la méthode directe à 275 nm. Pour chaque échantillonnage, on effectue les lectures en duplicata et l'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre UV visible DMS 200 de la compagnie Varian.

3.8 Bioessais

Les bioessais sont effectués à l'aide de larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana*. Les larves sont exposées à une diète semi synthétique contenant du formaldéhyde et de l'hydroxyde de potassium et selon la méthode d'incorporation à la diète (Beegle, 1990). Dans cette méthode, 1.5 ml d'échantillon dilué est mixé à 30 ml d'un mélange de diète et d'agar maintenu à plus de 45°C. La composition de la diète est présentée dans le Tableau 3. On distribue ensuite 1ml du mélange dans 20 petits tubes à fond plat. Après solidification de la diète, une larve est placée dans chaque tube. Les tubes sont recouverts de bouchons en plastique perforés et placés à température de la pièce pour 7 à 10 jours. On utilise trois dilutions de chaque

échantillon et un standard pour chaque série de bioessais. Un utilise également un contrôle (milieu de culture stérilisé + diète) afin de s'assurer de la qualité de la diète. Si la mortalité des larves excède 10% dans le contrôle, toute la série de bioessais doit être reprise. L'entomotoxicité des échantillons de Bt est calculée selon la mortalité observée par rapport à celle observée pour le standard et est exprimée en Unités Internationales de toxicité par µL (UI/µL). Les larves qui n'ont pas doublé de taille seront comptées comme mortes. Pour nos expériences, l'entomotoxicité est calculée en divisant la mortalité des larves en présence de l'échantillon par celle observée face au Foray 76B ($76x10^9$ UI/gallon) et en multipliant la toxicité du Foray 76B (20105.8 UI/µL).

Tableau 3 : Composition de la diète artificielle (Beegle, 1990)

Ingrédients	Quantité
Eau distillée	5000 ml
Caséine (non vitaminée)	28 g
Hydroxyde de potassium 4M	4 g
Alphacel	4 g
Mélange de sels (Wesson)	8 g
Germe de blé	24 g
Chlorure de choline	0,8 ml
Solution vitaminée	8 ml
Acide ascorbique	3,2 g
Formaldéhyde 40%	0,4 ml
Sucrose	28 g
Agar	20 g
Solution vitaminée	
Eau distillée	100 ml
Niacine	100 mg
Pantothénate de calcium	10 mg
Riboflavine	50 mg
Hydrochlorure de thiamine	25 mg
Hydrochlorure de pyridoxine	25 mg
Acide folique	25 mg
Vitamine B12	0,2 mg
Biotine	2 mg

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

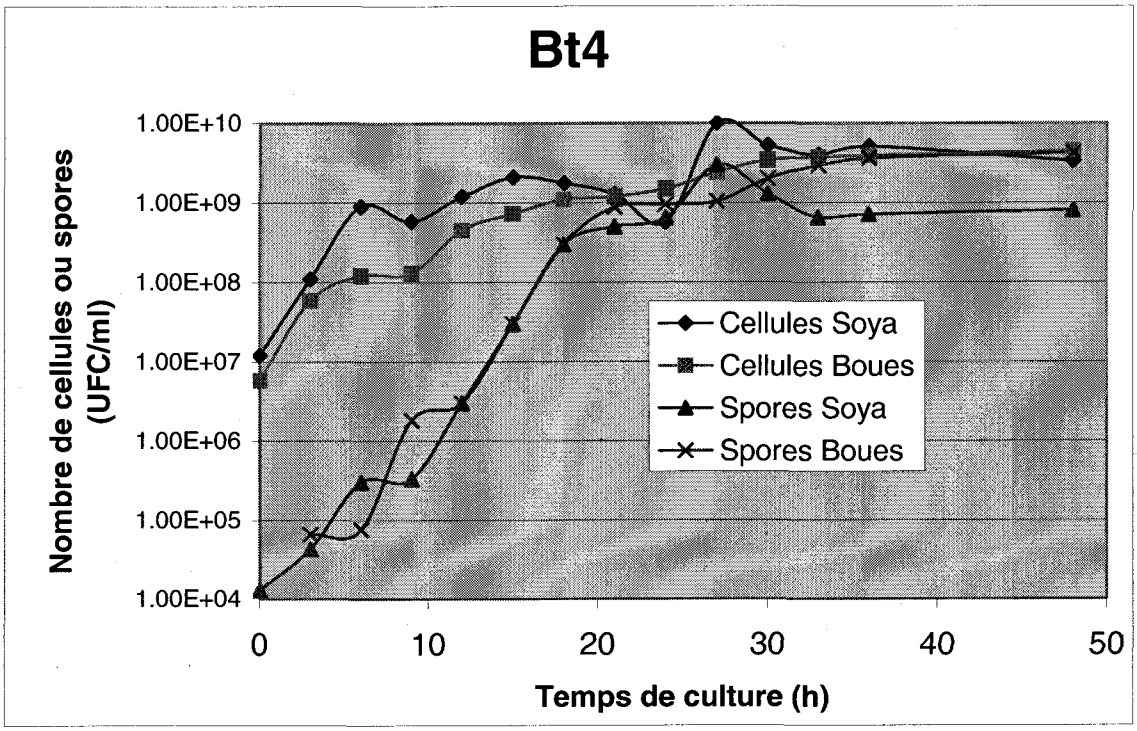
Les données présentées dans les Figures 3 à 9 se trouvent sous forme de tableaux dans les Annexes B à H.

4.1 DÉCOMPTE DES CELLULES ET SPORES VIABLES

On effectue le décompte des cellules et des spores viables au fur et à mesure qu'on procède à la fermentation (Figure 3). Les résultats des décomptes varient selon la nature du milieu de fermentation employé, ainsi que de la souche de Bt étudiée. De manière générale, on obtient des comptes de cellules maximums entre 10^9 et 10^{10} cellules par millilitre et des comptes de spores maximums aux environs de 10^9 spores par millilitre. Bt4 et Bta sont les souches présentant des décomptes de cellules et de spores très élevés, à environ 10^{10} cellules ou spores par millilitre, mais chaque souche possède ses caractéristiques propres.

On observe que les courbes diffèrent grandement selon la nature du milieu. Pour toutes les souches cultivées dans les biosolides, on remarque que le nombre de cellules et de spores ne cessent d'augmenter jusqu'à la fin de la fermentation. En milieu soya, le maximum de cellules est atteint après environ 30 heures de fermentation et celui de spores entre 36 et 48 heures de fermentation. Pour certaines souches (Bt6, 8, 12, 14 et 21), les résultats pour les décomptes de cellules et de spores sont supérieurs lorsqu'elles sont cultivées en biosolides, alors que pour les autres (Bt4, 24, a et k) les décomptes sont plus élevés en milieu soya.

Le Tableau 4 présente les taux de croissance spécifique maximal (μ max) pour chacune des souches, et ce, dans le milieu soya et les biosolides. Ce taux permet de connaître l'augmentation de nombre de bactéries par unité de temps (Atlas et Barthas, 1998). On obtient cette valeur en trouvant la pente de courbe lors de la phase exponentielle. Ces données nous permet de comparer la croissance de Bt en milieu soya et en biosolides.



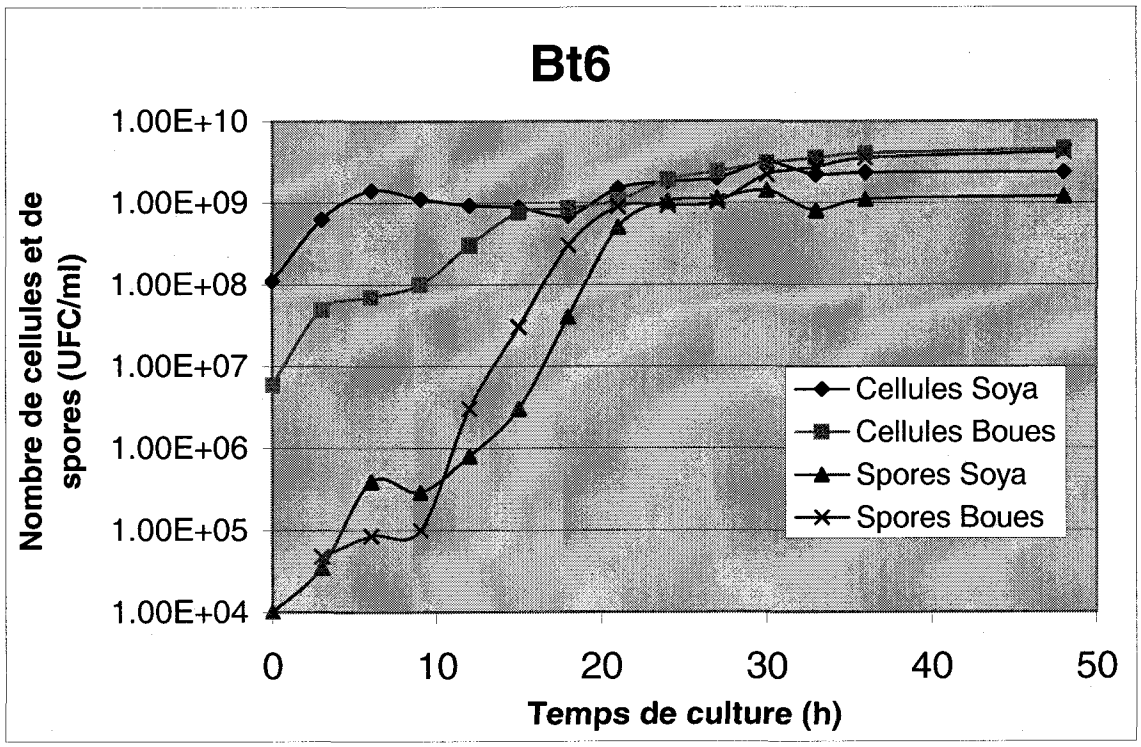
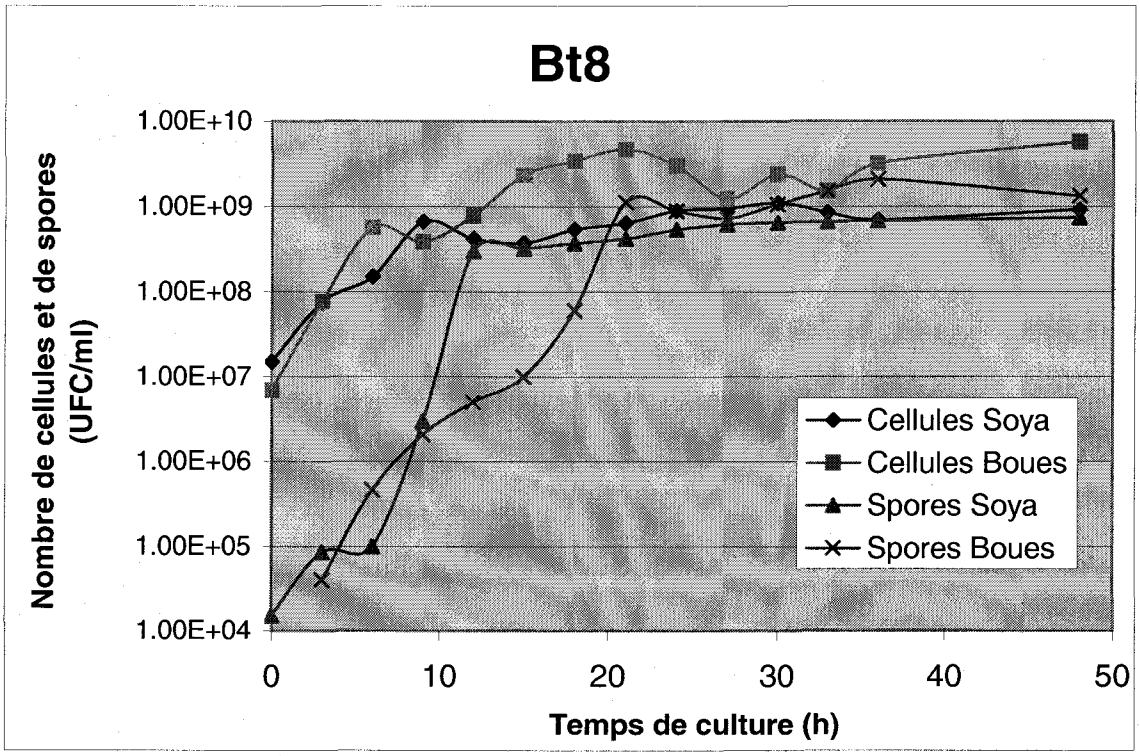


Figure 3a : Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



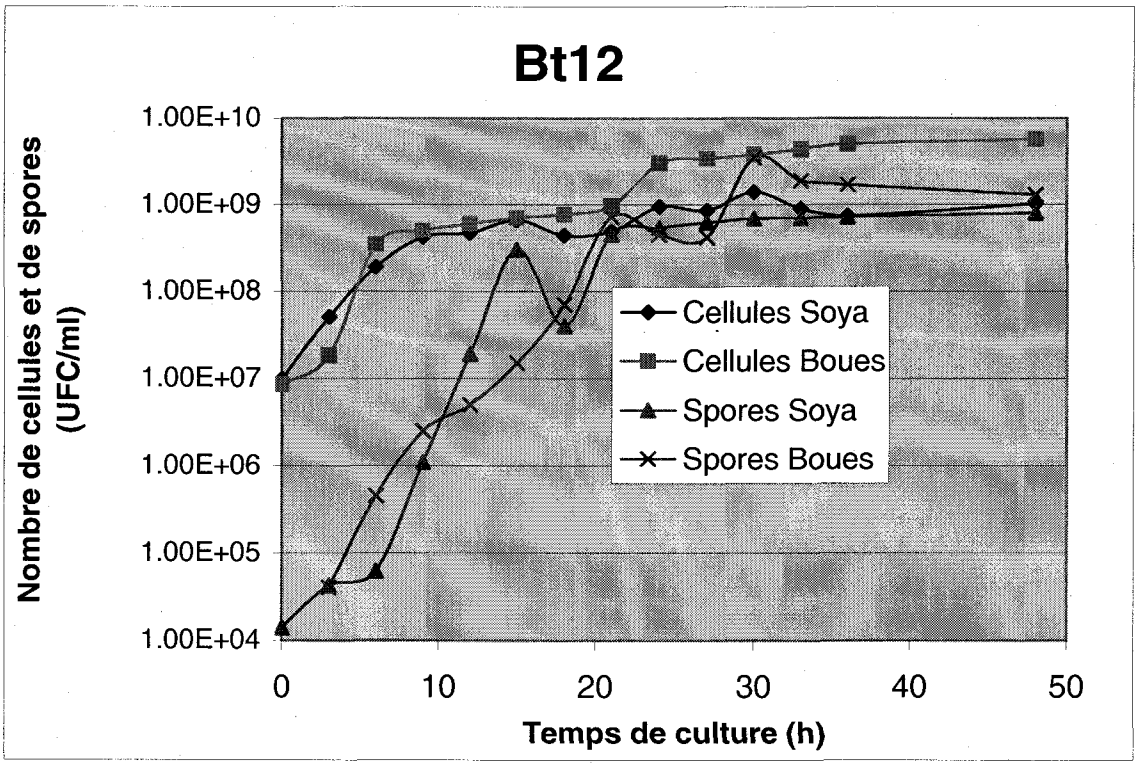
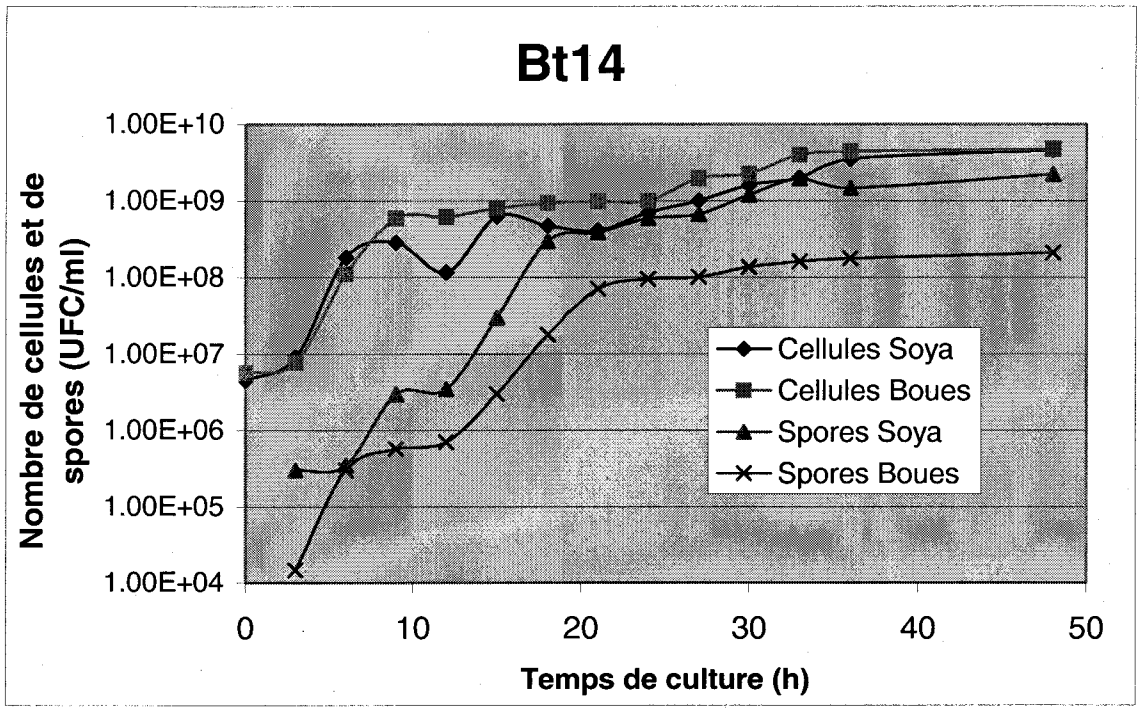


Figure 3b : Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



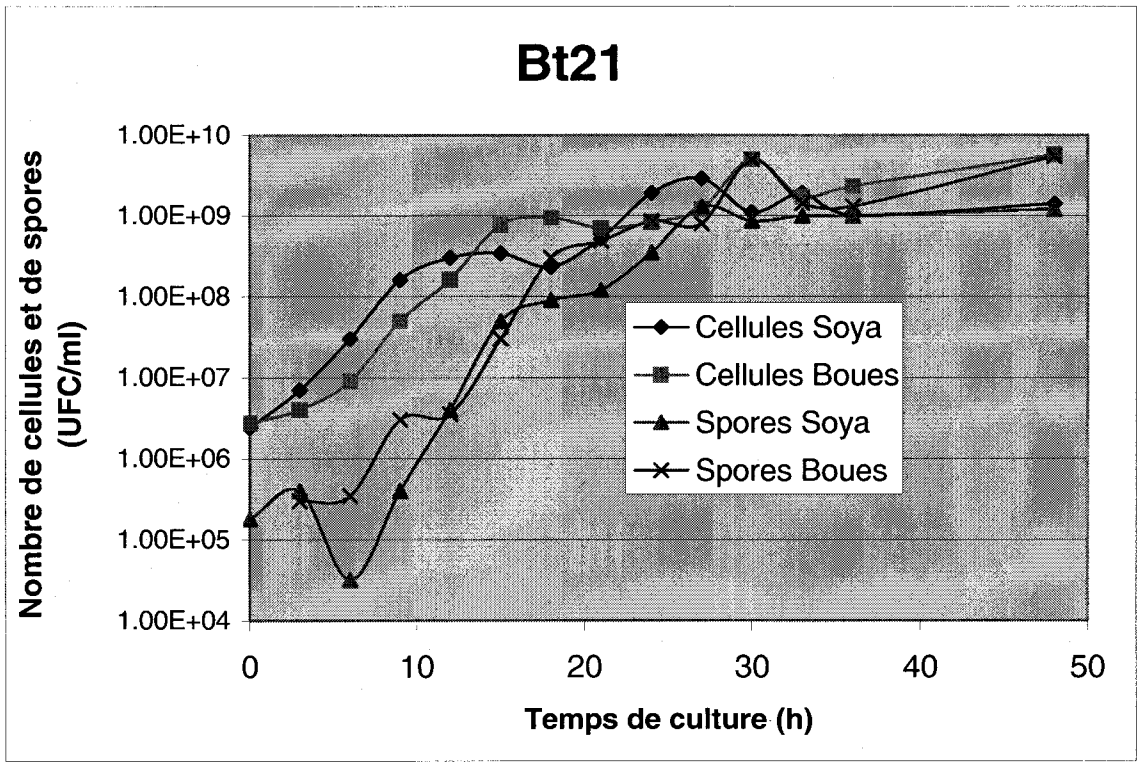
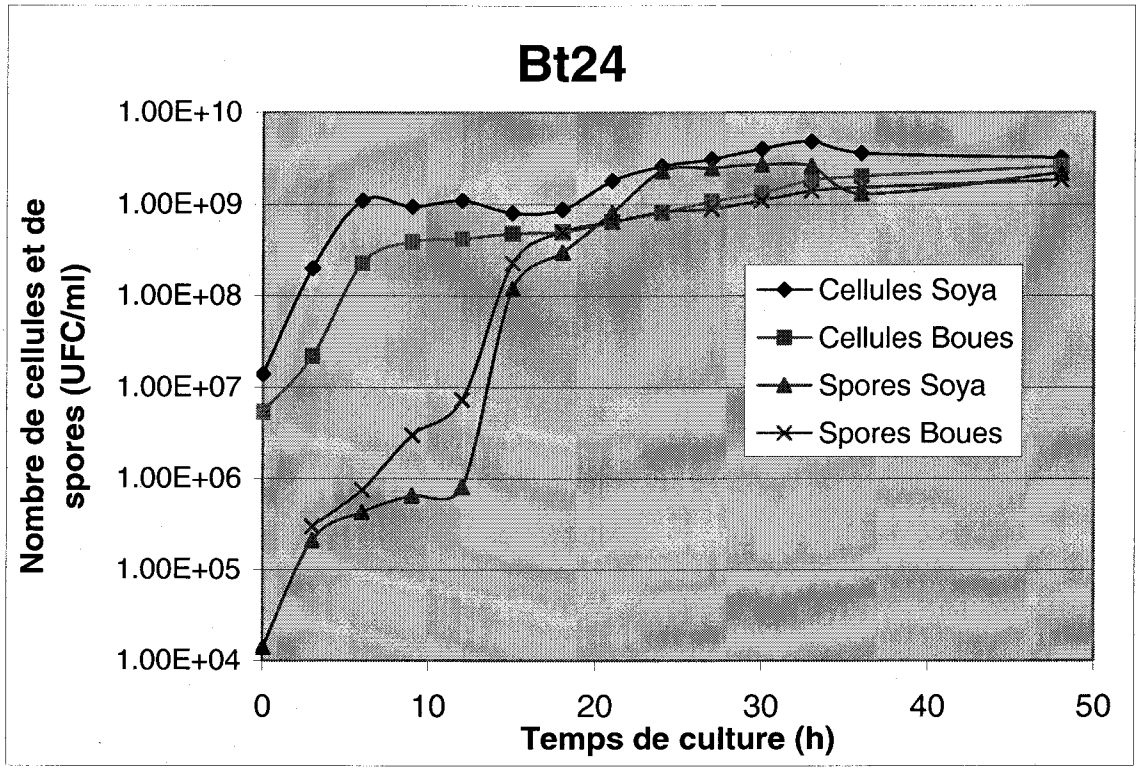


Figure 3c : Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



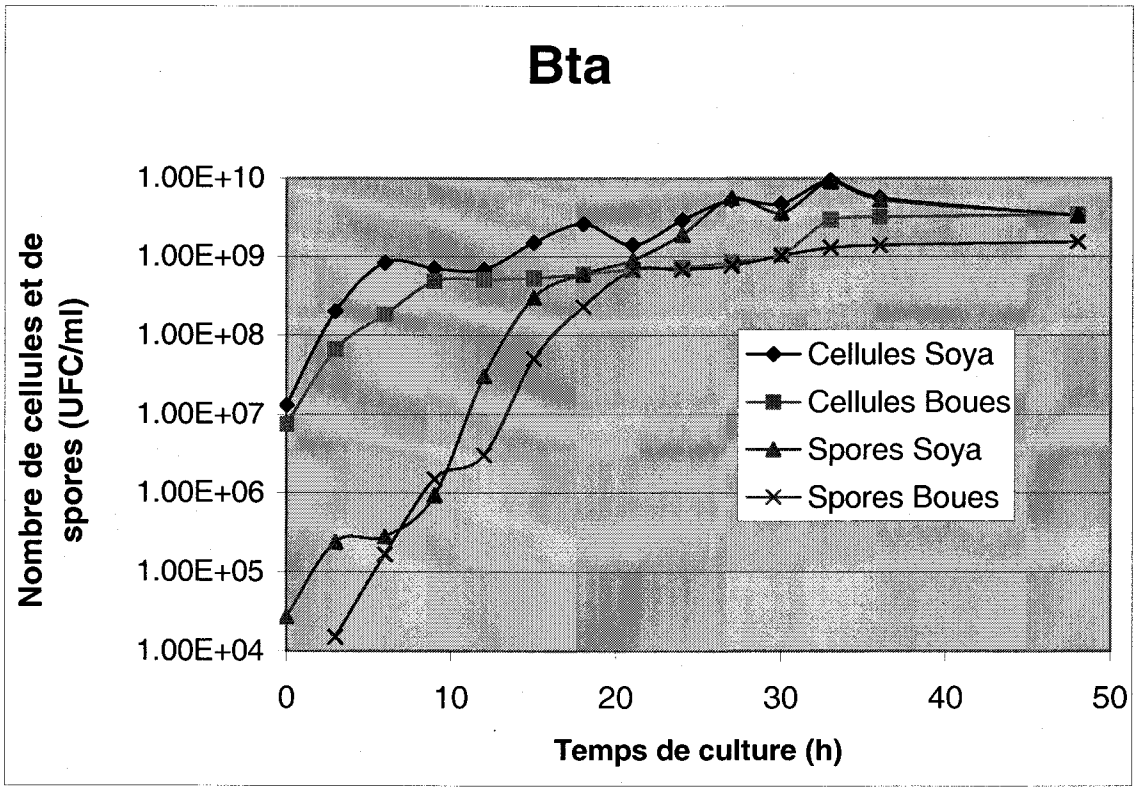


Figure 3d : Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

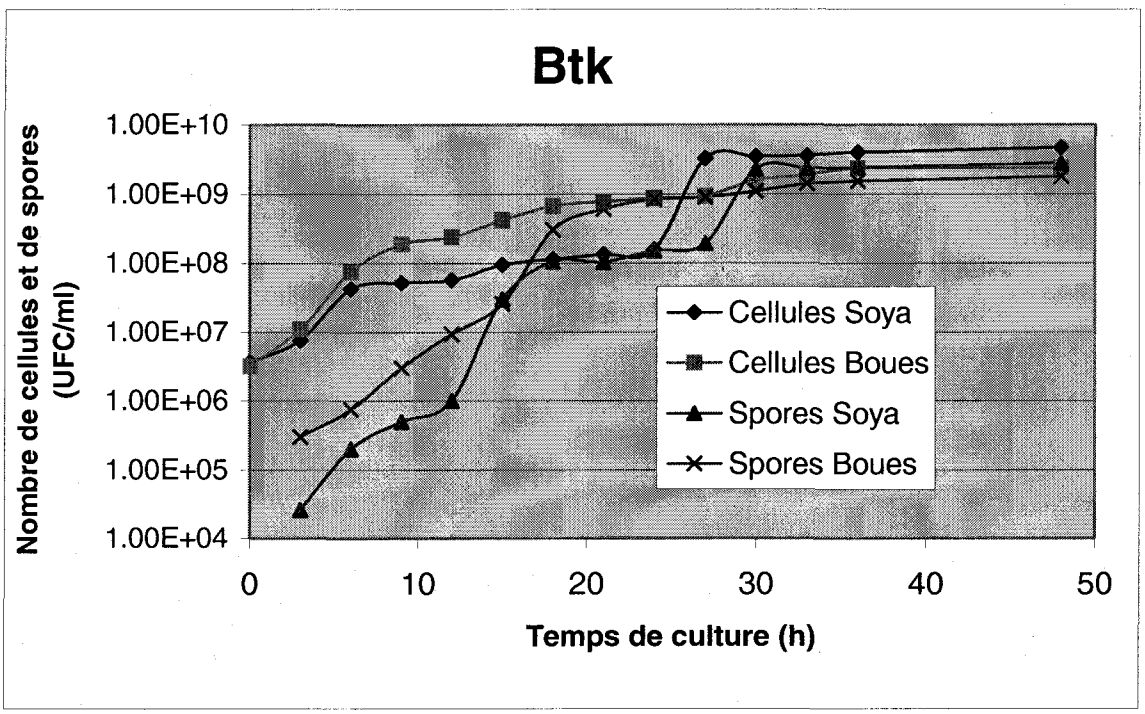


Figure 3e : Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Tableau 4 : Taux de croissance spécifique maximal (µ max) pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Souche de Bt	u max	
	Soya	Boues
4	0.458	0.506
6	0.424	0.412
8	0.402	0.469
12	0.420	0.504
14	0.516	0.553
21	0.469	0.544
24	0.478	0.456
a	0.447	0.452
k	0.410	0.471

L'utilisation des fermenteurs permet de contrôler plusieurs paramètres de la fermentation, tels que le pH, la température, l'aération et l'agitation. Ceci assure de meilleures conditions de culture, permettant ainsi un rendement maximum de la production bactérienne et de ses métabolites. Plusieurs études ont prouvé que l'utilisation des fermenteurs offre une production plus élevée de Bt par rapport à l'emploi de fioles, permettant d'obtenir une meilleure entomotoxicité et activité enzymatique (Tyagi *et al*, 2001). Principalement, la culture en fermenteur permet un bien meilleur transfert de l'oxygène qu'en fiole et un meilleur contrôle du pH. Les fluctuations de pH ne peuvent être contrôlées en fioles, affectant ainsi la production de protéases.

Les comptes de cellules et de spores viables donnent de bons résultats, prouvant ainsi que Bt croît aussi bien en milieu soya que dans les biosolides. Même si chacune des souches possèdent leurs propres caractéristiques, elles donnent toutes de bons décomptes, c'est-à-dire entre 10^9 et 10^{10} cellules par millilitre et environ 10^9 spores par millilitre. Un nombre élevé de cellules ne garantie pas une proportion plus élevée des métabolites, mais la probabilité d'une production plus importante augmente proportionnellement au nombre de cellules viables. On remarque cependant une baisse du nombre de spores pour Bt12 à 18 heures et pour Bt21 à 6 heures. Cela pourrait être dû à une fausse manipulation lors de l'analyse des échantillons.

Les différences observées quant au milieu de culture employé sont propres aux souches bactériennes utilisées. Ainsi, certaines souches se développent mieux en milieu soya qu'avec les biosolides et vice-versa. Comme les nouvelles souches ont été isolées des biosolides, il est concevable que certaines d'entre elles y poussent mieux. En effet, les souches peuvent déjà être acclimatées au milieu de culture et posséder les voies métaboliques nécessaires à leur croissance dans ce milieu spécifique. À titre de comparaison, Btk est une souche de référence n'ayant pas été isolée des biosolides. Cette souche n'a été mise en contact avec les biosolides que lors de la préculture. Sa croissance dans les biosolides est la moins élevée de toutes les souches étudiées (2,5 X 10^9 cellules/ml), alors qu'elle présente une croissance comparable aux autres souches en milieu soya (4,5 X 10^9 cellules/ml).

Un autre aspect important dans la comparaison de la performance des souches dans les deux milieux est la forme des courbes obtenues. La croissance ininterrompue des cellules et des spores viables en biosolides indique qu'il n'y a pas de restrictions dans l'utilisation des nutriments. Les éléments présents dans les biosolides et nécessaires à la croissance de Bt sont disponibles jusqu'à la fin de la fermentation. On n'observe donc pas la phase de mortalité qui survient lorsque les nutriments du milieu on été épuisés et que les cellules commencent à mourir, faute d'éléments essentiels. Par opposition, on observe le pic de croissance des cellules et des spores en milieu soya après environ 30 heures de fermentation. La courbe de croissance diminue légèrement après ce délai. On peut ainsi penser que les nutriments du milieu soya commencent à s'épuiser après une trentaine d'heures.

Les taux de croissance spécifiques maximaux nous permettent de justifier l'hypothèse selon laquelle les biosolides contiennent les nutriments capables de supporter la croissance de Bt. Un bon taux de croissance spécifique nous indique une bonne croissance des cellules et des spores. Les μ max des souches sont semblables dans les deux milieux de culture. Pour la plupart des souches, le taux de croissance est plus élevé dans les biosolides qu'en milieu soya, ce qui indique que les biosolides donnent d'aussi bons résultats de comptes de cellules que le milieu utilisé en industrie. Les valeurs de taux de croissance spécifiques concordent avec celles obtenues par Vidyarthi *et al.* (2002).

4.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

4.2.1 Courbe d'étalonnage de tyrosine

La production de courbes d'étalonnage de tyrosine permet d'établir la relation entre la concentration en tyrosine d'un échantillon et l'absorbance mesurée. Lors des expériences menées, 42 courbes d'étalonnage ont été effectuées avec la méthode à 275 nm et le Tableau 5 montre le peu de variation entre les différents étalonnages. À partir de ces courbes, d'absorbance, une relation linéaire est obtenue ($R^2 > 0,998$).

Tableau 5 : Absorbance mesurée à 275 nm selon les concentrations de tyrosine

Tyrosine (µM)	Absorbance Moyenne (D.O.)	Absorbance minimale (D.O.)	Absorbance maximale (D.O.)
0	0 ± 0	0	0
200	0,287 ± 0,012	0,263	0,295
400	0,574 ± 0,260	0,520	0,593
600	0,863 ± 0,040	0,779	0,891
800	1,155 ± 0,051	1,048	1,189
1000	1,449 ± 0,060	1,323	1,483

4.2.2 Activité enzymatique des nouvelles souches

L'activité enzymatique est obtenue en dosant la quantité de tyrosine libérée lors de l'hydrolyse de la caséine. On utilise la courbe d'étalonnage pour faire correspondre l'absorbance détectée à la concentration en tyrosine. On utilise ensuite l'équation suivante pour convertir les résultats en Unités Internationales par millilitres (UI/ml) :

$$\text{UI/ml} = \frac{[\text{ tyrosine } (\mu\text{ml/L})]}{10 \text{ minutes} * 10^3 \text{ ml}} * 11 \text{ ml} * \text{facteur de dilution}$$

Les résultats observés (Figure 4) sont très différents d'une souche à l'autre et d'un milieu à l'autre. On remarque des pics d'activité enzymatique près de 4,5 UI/ml pour les souches de Bt8, 14 et 21. Pour d'autres souches, l'activité enzymatique reste plus constante et les pics sont moins prononcés, comme pour Bt4 et Btk. De manière générale, on observe un

pic d'activité enzymatique avant 20 heures de fermentation, particulièrement en milieu soya.

La différence est très prononcée lorsqu'on compare les résultats obtenus selon la nature du milieu de fermentation. La courbe d'activité enzymatique en milieu soya est généralement plus élevée que celle obtenue avec les biosolides. Par contre, l'activité enzymatique demeure plus constante lors de la fermentation en biosolides. De plus, l'activité enzymatique tend à augmenter jusqu'à la fin de la fermentation en biosolides, alors qu'elle atteint un maximum très tôt en milieu soya, pour diminuer graduellement jusqu'à la fin.

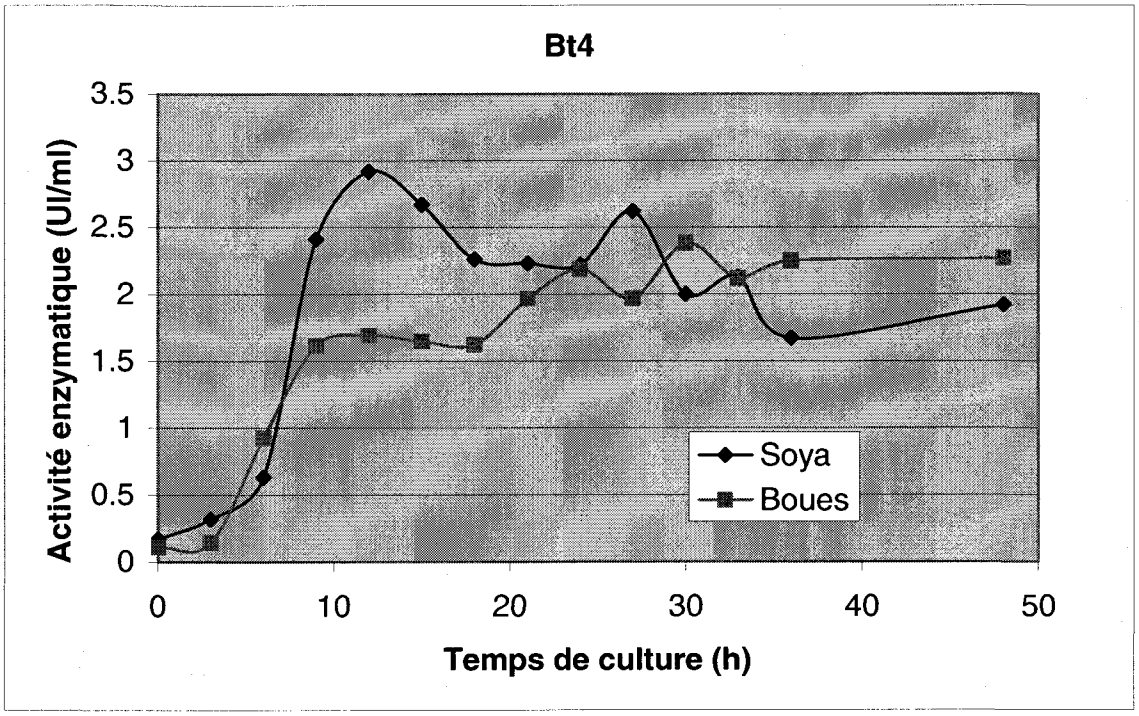
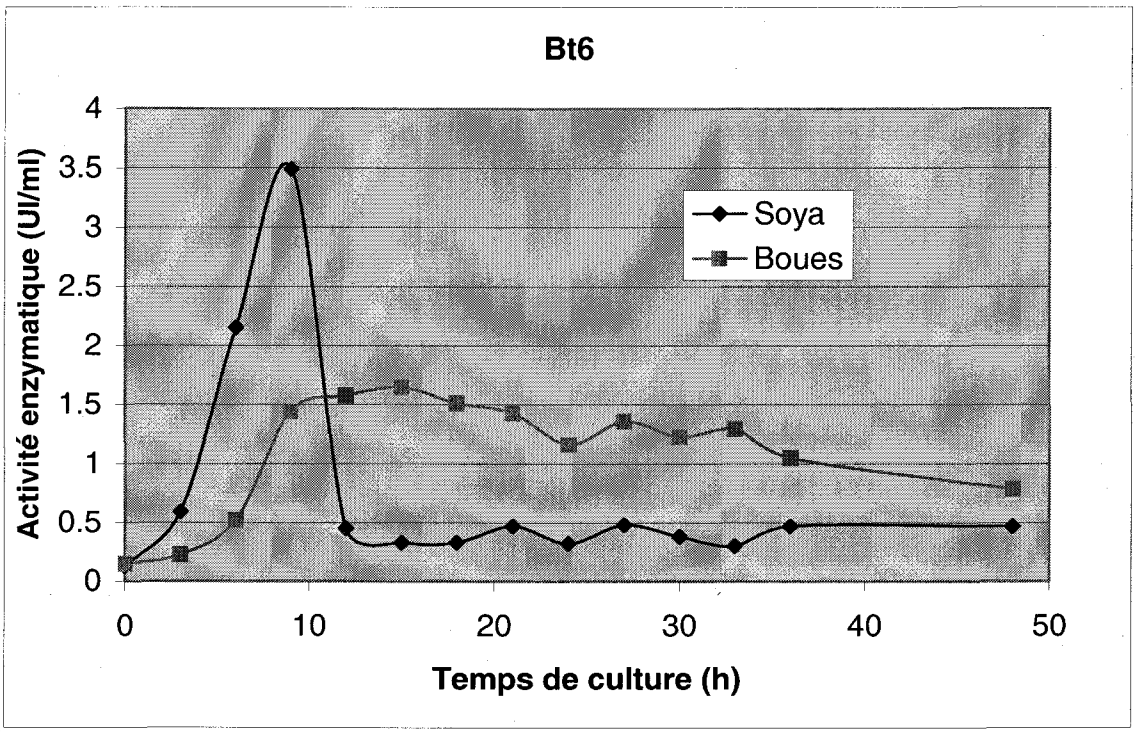


Figure 4a : Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



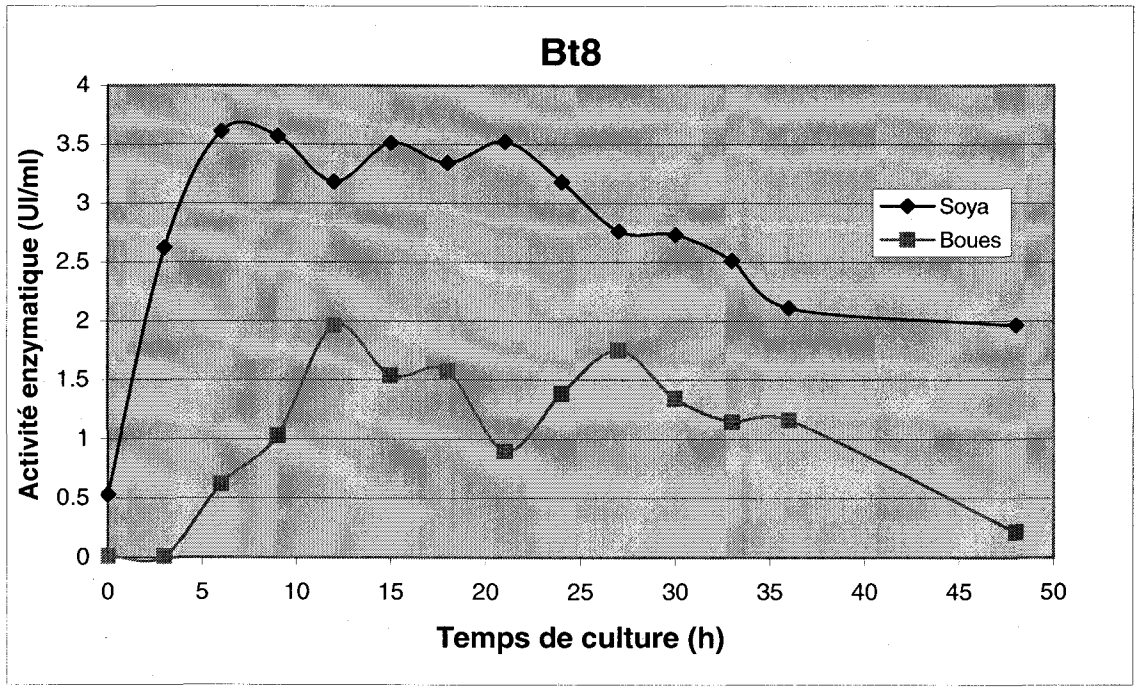
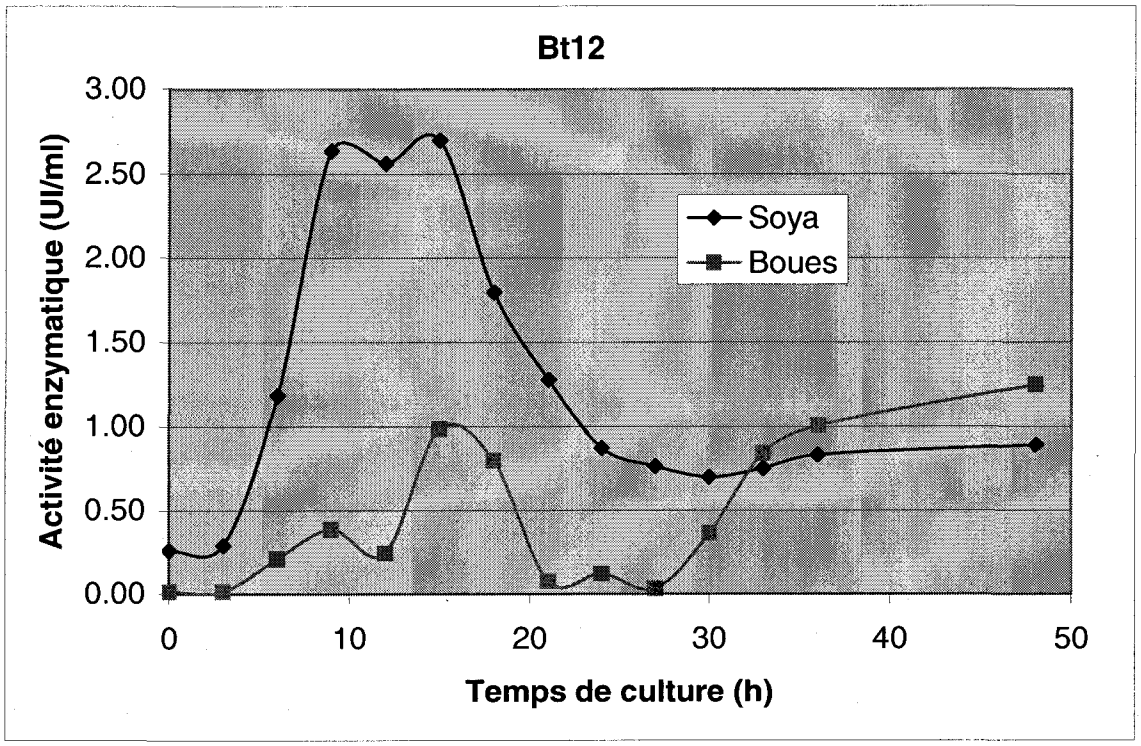


Figure 4b : Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



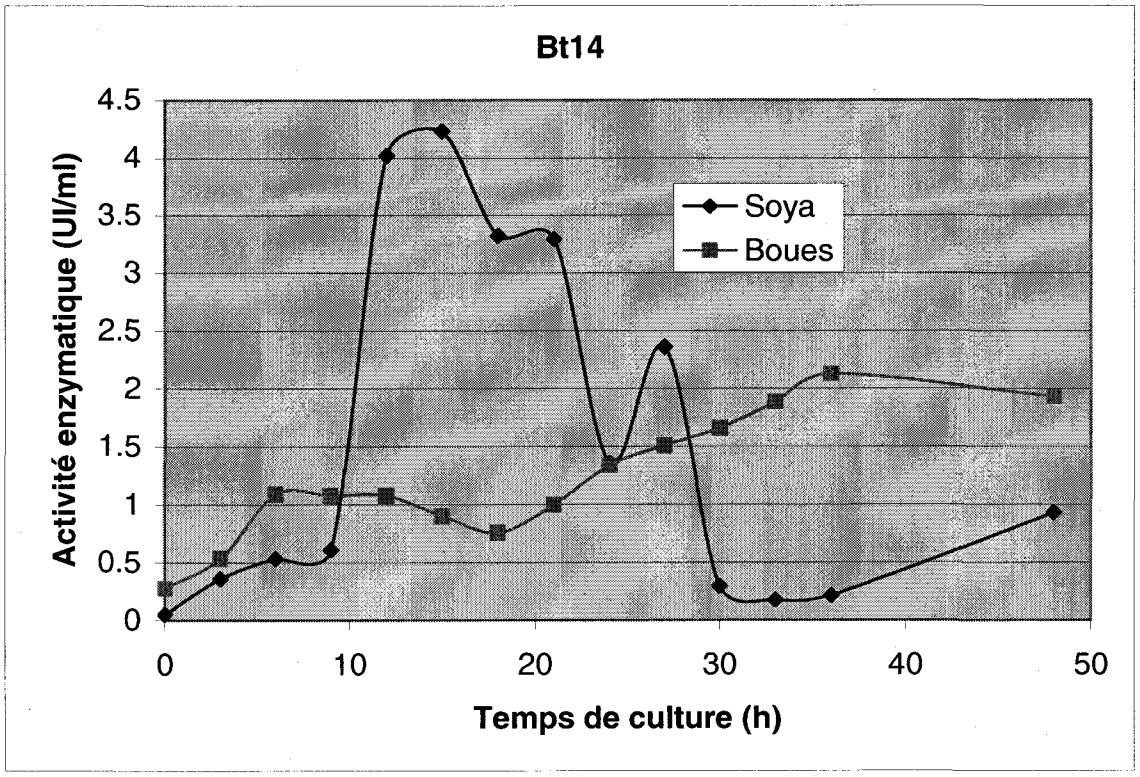
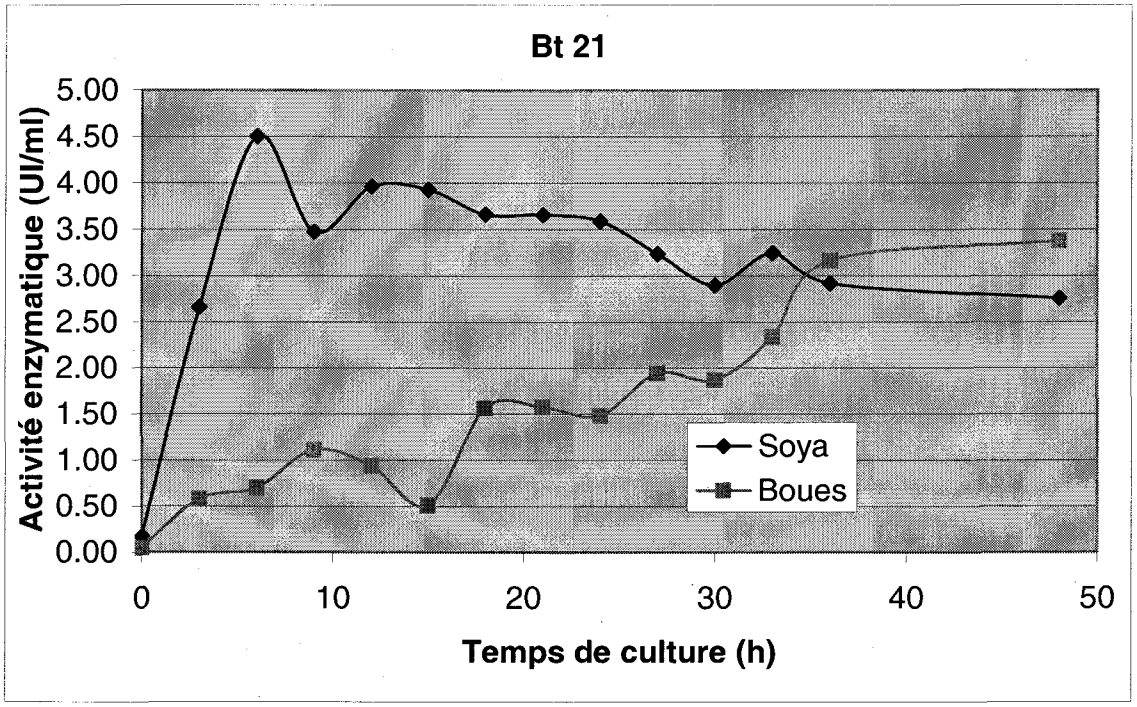


Figure 4c : Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



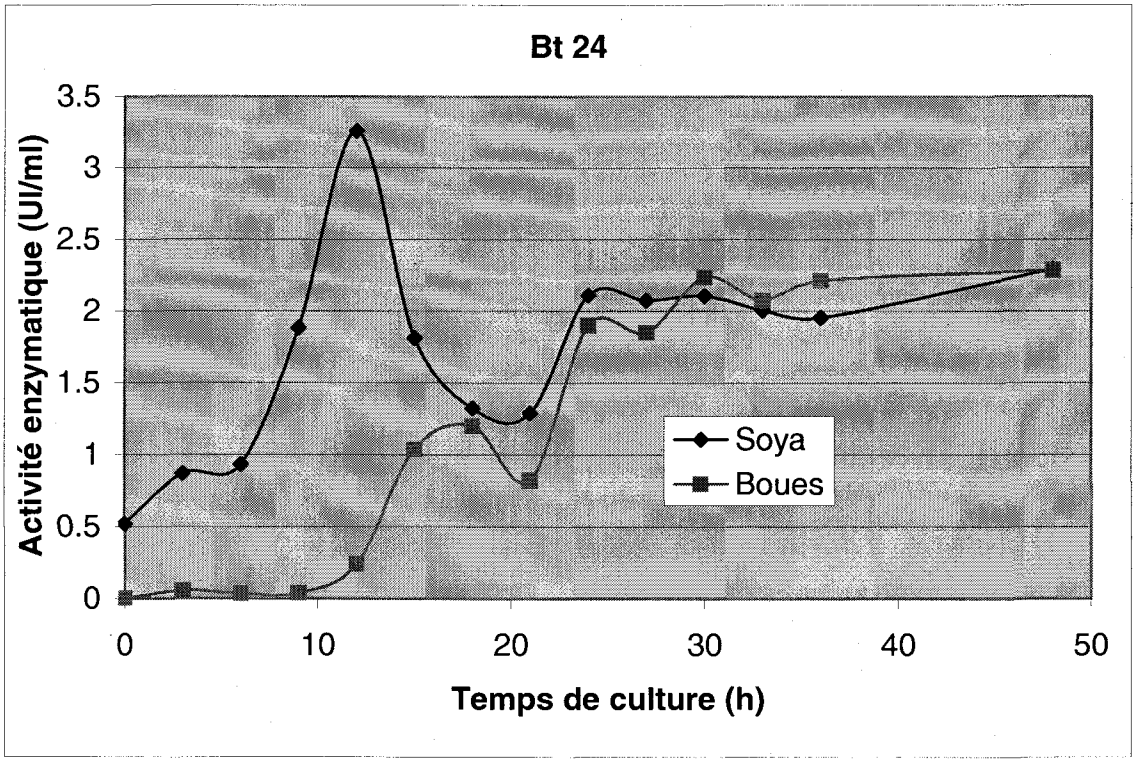
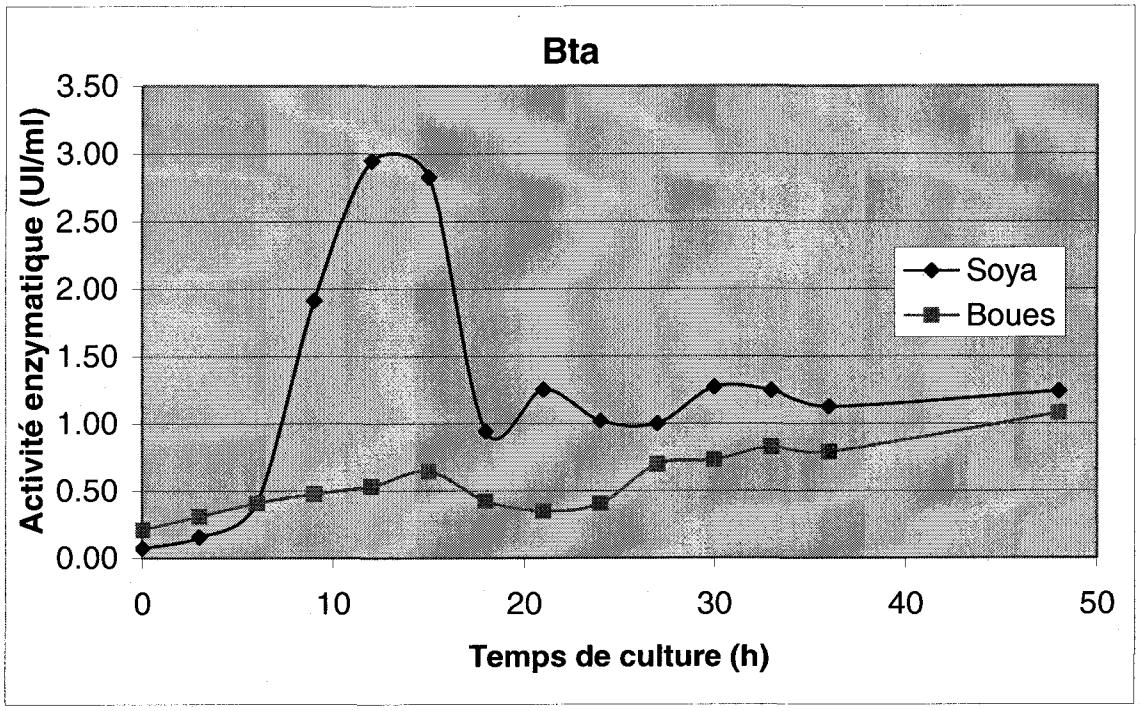


Figure 4d : Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



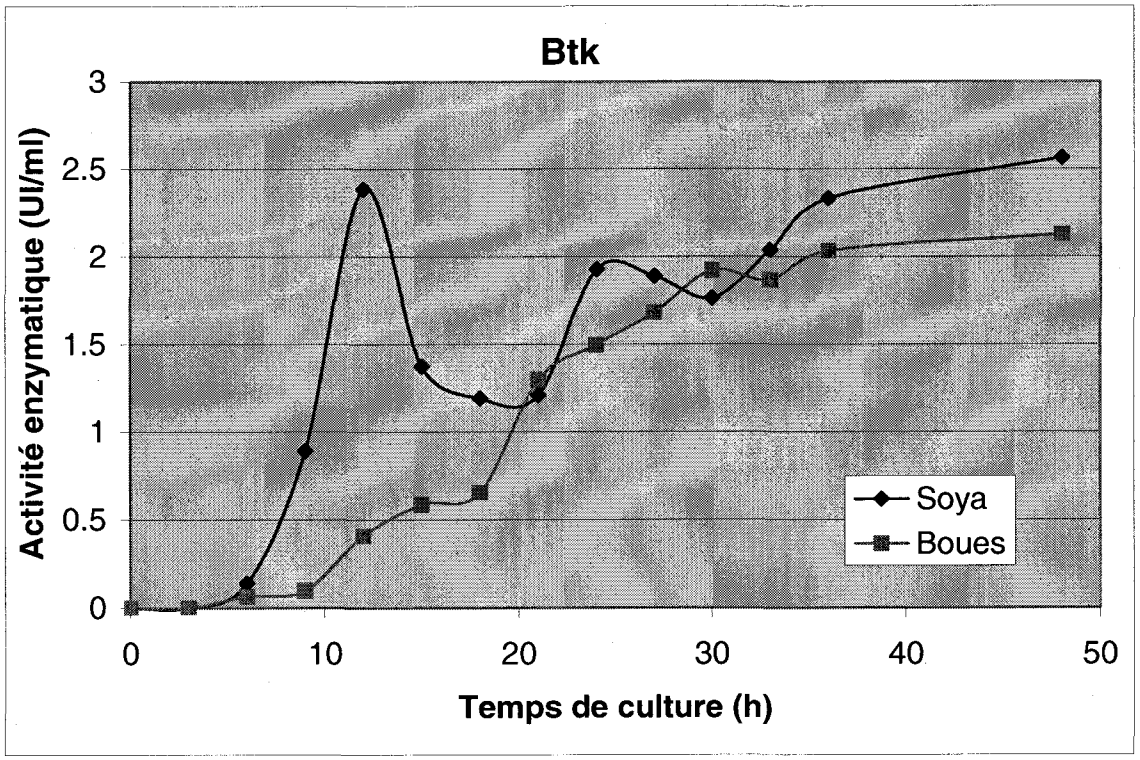


Figure 4e: Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Pour bien interpréter les résultats obtenus pour l'activité enzymatique des nouvelles souches de Bt, il faut bien comprendre le mode de fonctionnement des protéases et leur rôle dans le métabolisme de la bactérie. Les protéases servent à catalyser l'hydrolyse des protéines en brisant les liens peptidiques de ces molécules. Lorsque la bactérie est en phase exponentielle, plusieurs éléments sont nécessaires à sa croissance. Les protéases peuvent ainsi servir à approvisionner la bactérie en nutriments essentiels en scindant les protéines existantes en acides aminés et peptides de moindre taille. Si le milieu de culture ne peut supporter la croissance bactérienne parce que les molécules qu'il contient sont trop complexes et imposantes, la bactérie devra alors synthétiser les protéases pour dégrader les molécules afin d'obtenir les acides aminés dont elle a besoin.

Le pic d'activité enzymatique est atteint très tôt en milieu soya par rapport aux biosolides. Le milieu soya semble nécessiter une production des protéases peu de temps après le début de la fermentation, indiquant ainsi que ce milieu possède moins de nutriments facilement assimilables que les biosolides. Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'activité enzymatique obtenus en biosolides. De manière générale, les courbes sont beaucoup plus stables qu'en milieu soya et augmentent graduellement tout au long de la fermentation. La production des protéases se fait à mesure que la croissance bactérienne augmente. Les nutriments essentiels sont disponibles dans les biosolides dès l'initiation de la fermentation et les protéases sont synthétisées pour supporter la progression de la croissance. La production des protéases coïncide également à l'augmentation du nombre spores (Doi, 1972; Reddy *et al.*, 1998; Zouari et Jaoua, 1999). Ceux-ci nécessitent une quantité considérable d'acides aminés nécessaires à la formation de la spore que les protéines existantes peuvent fournir.

Les résultats d'activité enzymatique obtenus sont très différents d'une souche à l'autre. Les souches démontrant les meilleurs résultats en milieu soya (Bt8, 14 et 21) sont également celles ayant une activité enzymatique plus élevée en biosolides. On peut ainsi penser que ces souches produisent plus de protéases que les souches pour lesquelles on observe une activité enzymatique plus faible. Il est important de bien connaître les souches utilisées, surtout si l'usage industriel est envisagé, car il faut pouvoir identifier le moment de la fermentation où la production des protéases est à son maximum.

Les résultats d'activité enzymatique obtenus pour les souches Bt4, 6, 8, 12 et k concordent avec ceux de Mohammedi (2001) pour les boues secondaires. Les courbes observées sont, par contre, plus stables que dans ses travaux, indiquant un meilleur maintien des conditions ou, tout simplement, une qualité de biosolides supérieure. Mohammedi (2001) attribuait l'instabilité de l'activité enzymatique aux caractéristiques du milieu. La faible concentration de soufre dans les boues secondaires utilisées pouvait être un facteur, puisque celui-ci joue un rôle important dans la formation de ponts disulfure, maintenant ainsi la stabilité moléculaire de l'enzyme (Rao et *al*, 1998). Les boues secondaires utilisées lors de nos expériences contenaient presque deux fois plus de soufre (7685 mg/kg par rapport à 3932 mg/kg), expliquant ainsi la plus grande stabilité de l'activité enzymatique. L'instabilité a également été attribuée au procédé du traitement secondaire qui implique une digestion par des micro-organismes, réduisant ainsi la quantité de protéines disponibles pour les bactéries mises en culture.

Suite à l'analyse de l'activité enzymatique, un échantillon est sélectionné afin de procéder aux tests de caractérisation des protéases. L'échantillon choisi est celui présentant l'activité enzymatique la plus élevée parmi les prélèvements effectués à 12, 24, 36 et 48 heures (Tableau 6).

Tableau 6 : Identification des échantillons des différentes souches de *Bacillus thuringiensis* utilisés pour la caractérisation des protéases.

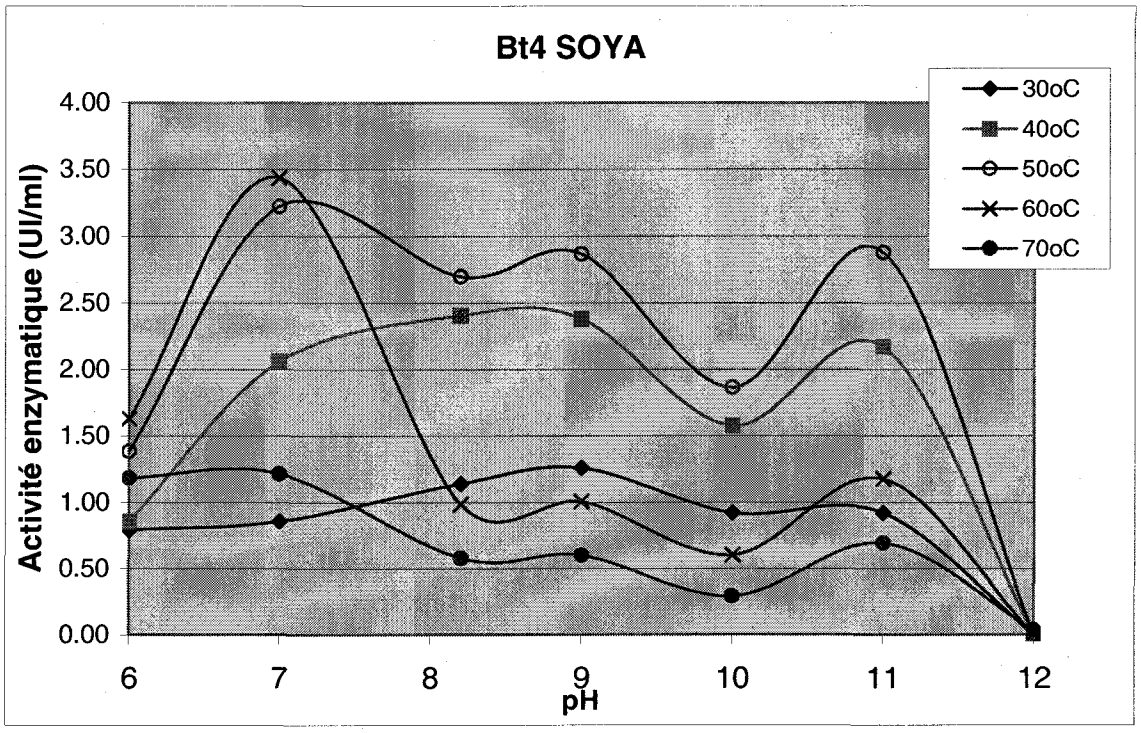
Souche de Bt	Soya	Biosolides
4	24 heures	24 heures
6	48 heures	12 heures
8	24 heures	12 heures
12	24 heures	48 heures
14	24 heures	36 heures
21	24 heures	48 heures
24	48 heures	36 heures
a	48 heures	48 heures
k	48 heures	48 heures

4.3 CARACTÉRISATION DES PROTÉASES

4.3.1 Température et pH

L'étude des effets de la variation du pH et de la température est effectuée à l'aide de plusieurs solutions tampons de pH différents (6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) qui sont utilisées pour préparer la solution de caséine (les préparations des solutions tampons se trouvent à l'Annexe A). La concentration de la solution de caséine demeure à 1,2%. Les tests sont effectués selon la méthode standard, donc les quantités d'échantillon et de TCA restent les mêmes. La température d'incubation varie selon la température étudiée (30, 40, 50, 60 et 70°C). L'analyse des résultats est la même que pour les échantillons analysés selon la méthode standard.

Les résultats obtenus varient selon la souche de Bt étudiée et le milieu utilisé (Figure 5). Plusieurs observations peuvent être faites pour chacune des souches. Bt4, 8, 21 et k présentent des pics d'activité enzymatique très élevés (entre 3,0 et 4,5 UI/ml) pour des températures entre 40 et 60°C. Les souches Bt12 et 24 présentent des activités enzymatiques plus faibles, c'est-à-dire entre 1,0 et 3,0 UI/ml. En ce qui concernent les souches de Bt6, 14 et a, on remarque des différences marquées les résultats entre le milieu soya et les biosolides. Pour ces souches, les résultats sont particulièrement inférieurs en milieu soya par rapport à ceux obtenus dans les biosolides. Les autres souches montrent des activités enzymatiques relativement semblables en milieu soya et en biosolides. De manière générale, les courbes d'activité enzymatiques sont plus élevées dans les biosolides qu'en milieu soya, avec Bta comme seule exception. Les pics d'activité enzymatique sont également plus distinctifs dans les biosolides qu'en milieu soya. Par contre, pour presque toutes les souches, on observe des pics d'activité enzymatique pour les pH 7, 9 et 11. On remarque que plus l'activité enzymatique est élevée, plus les pics sont prononcés. Par exemple, la souche Bt12 possède une activité enzymatique plutôt faible (< 2UI/ml) et présente des courbes avec plusieurs pics, mais sans qu'une tendance ne ressorte.



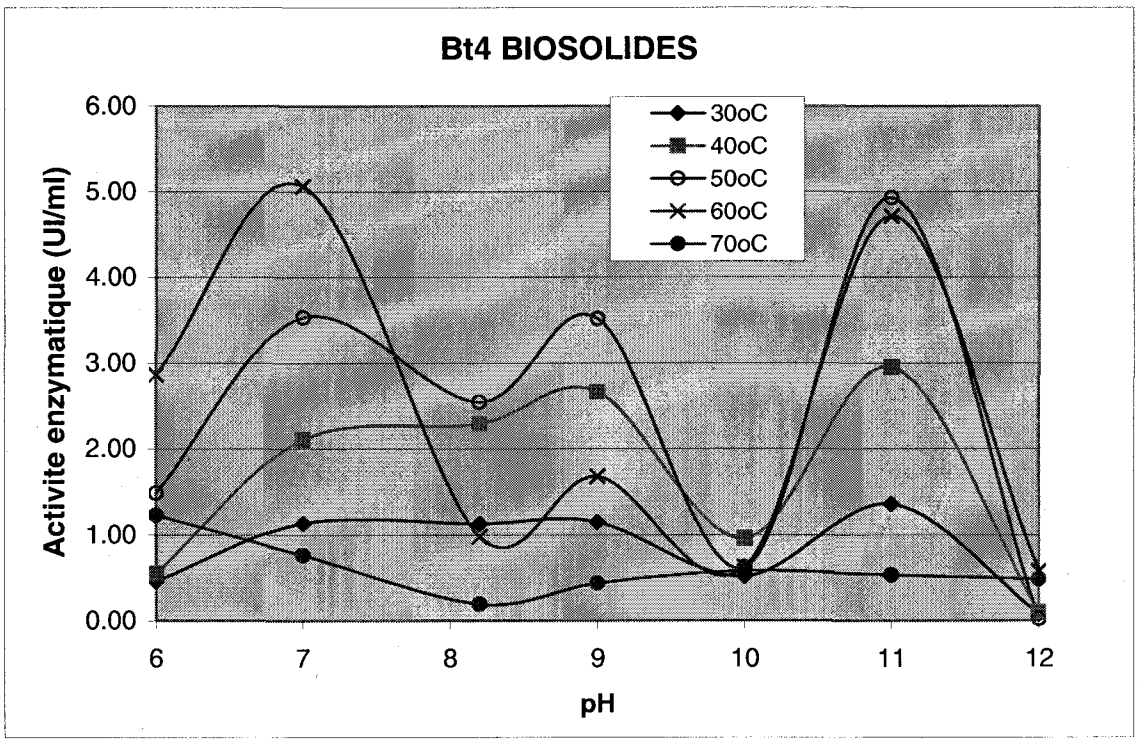
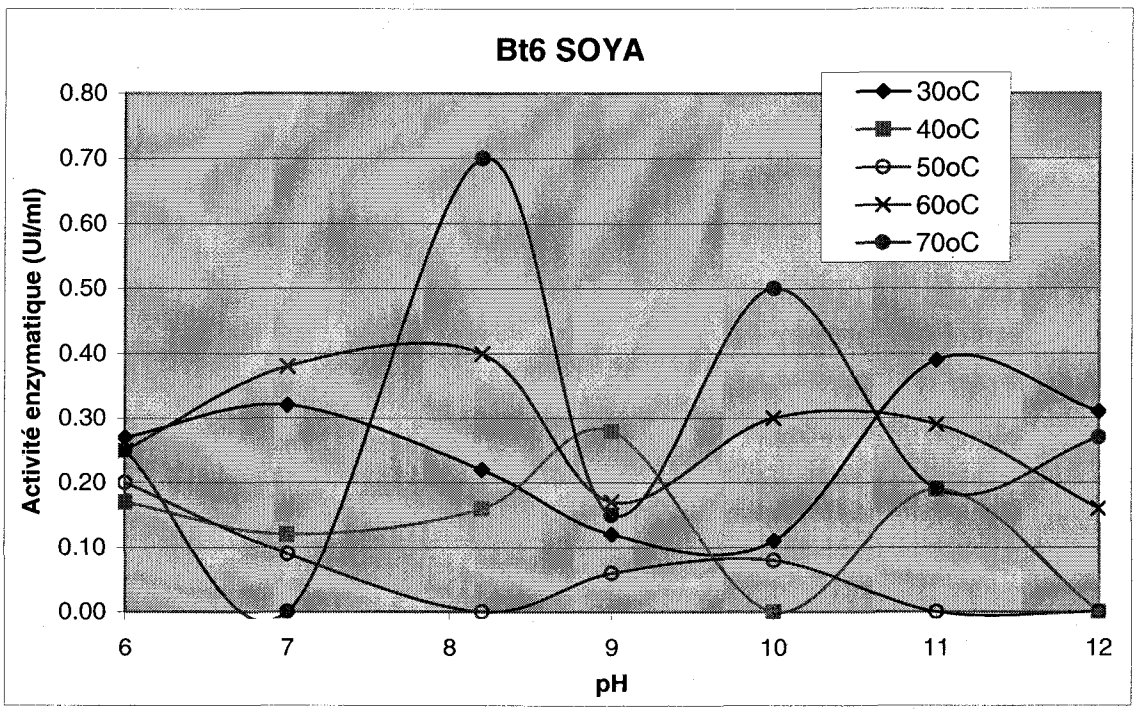


Figure 5a : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



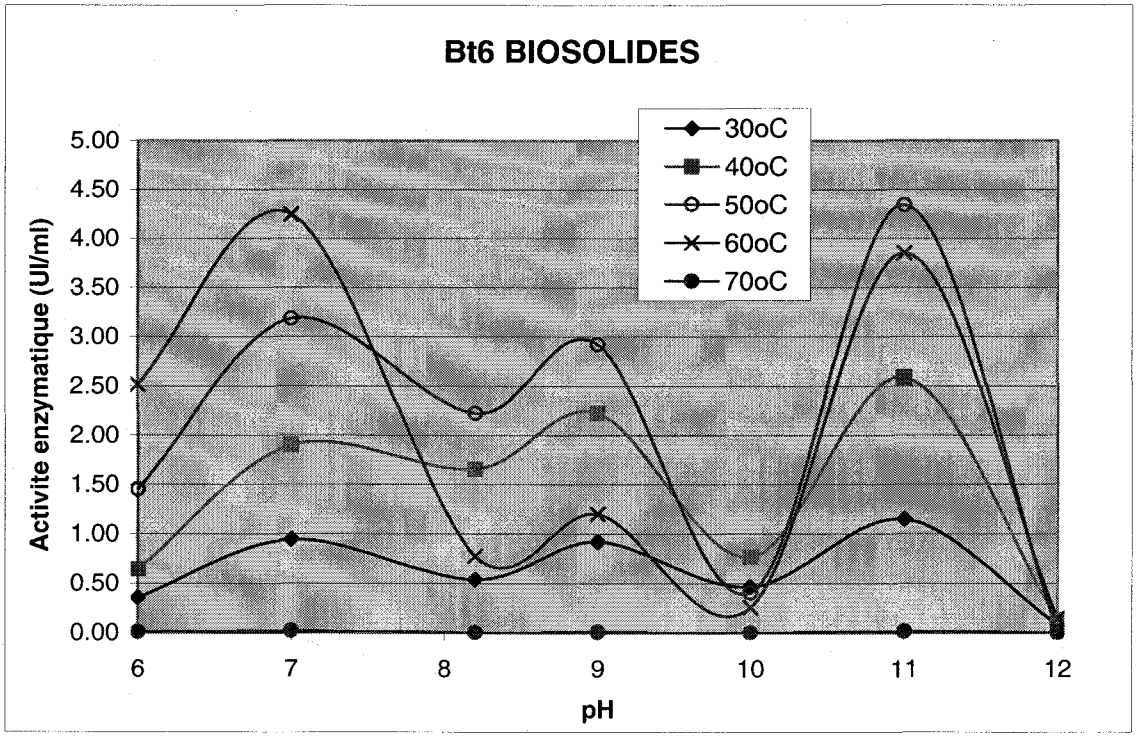
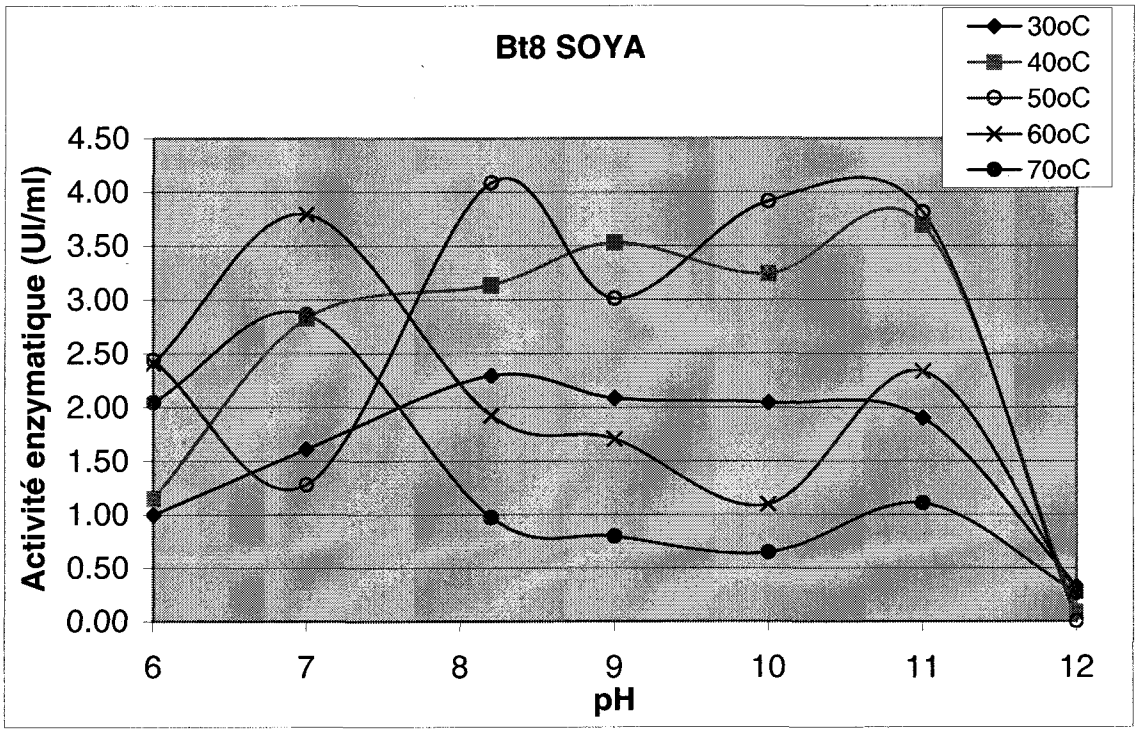


Figure 5b : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



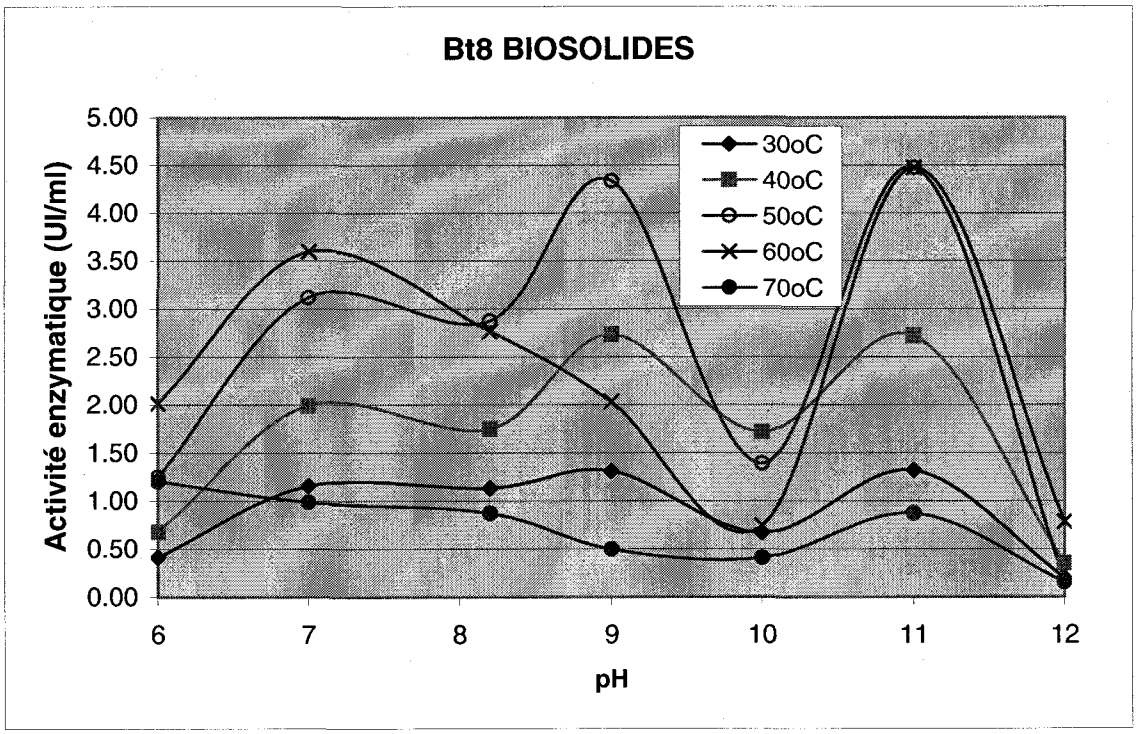
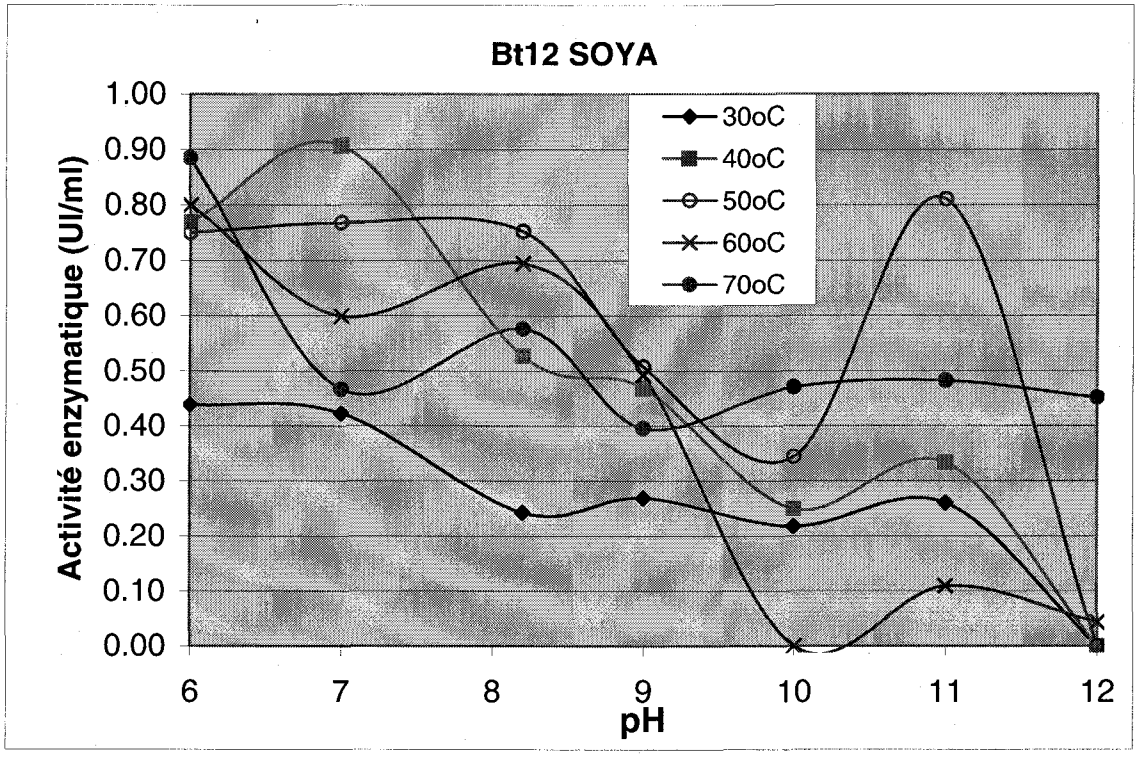


Figure 5c : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



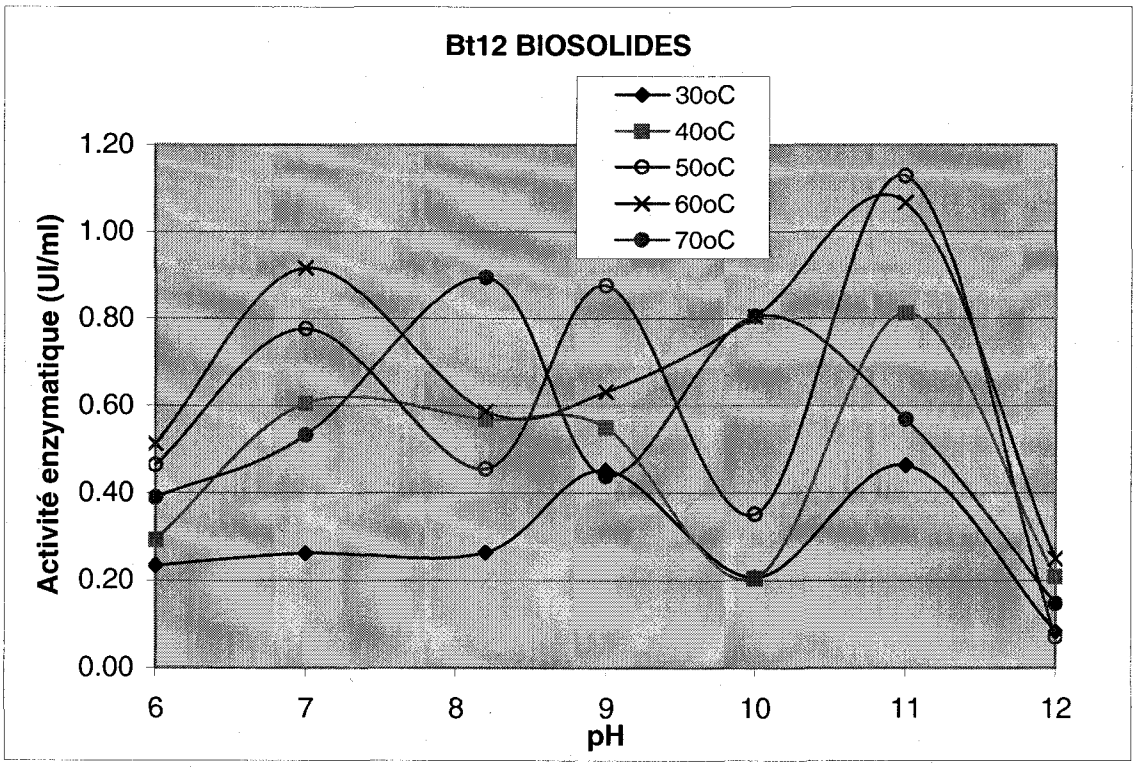
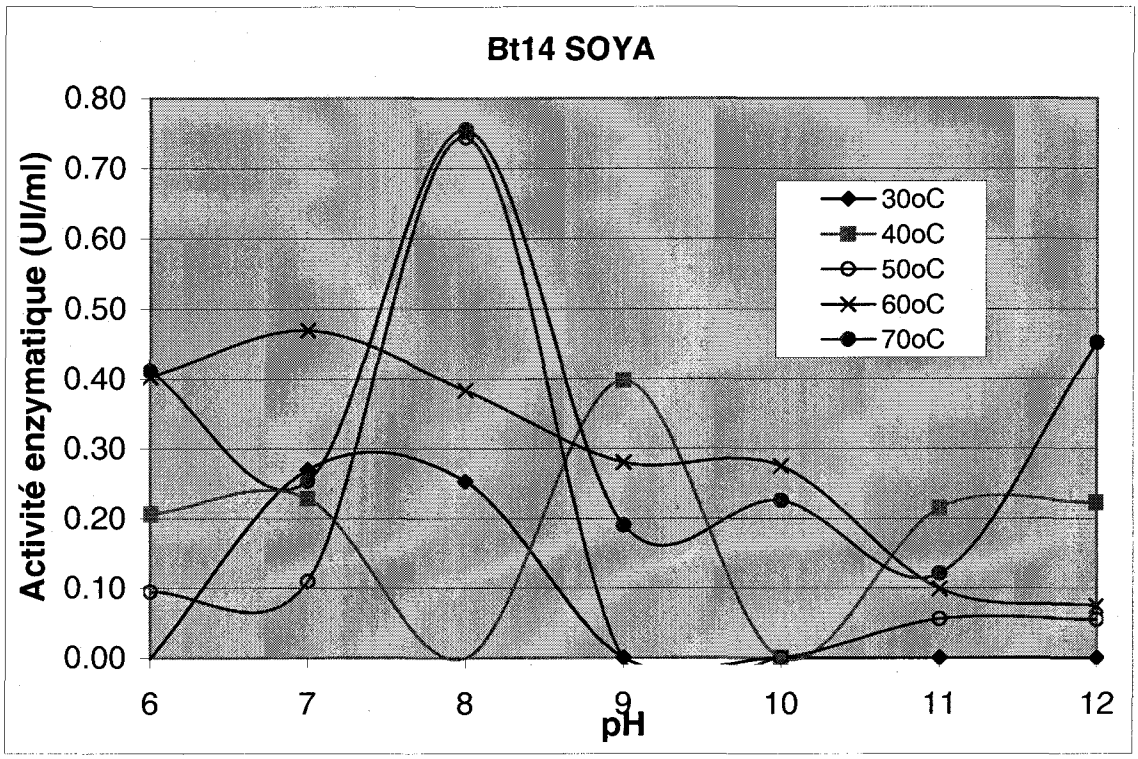


Figure 5d : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



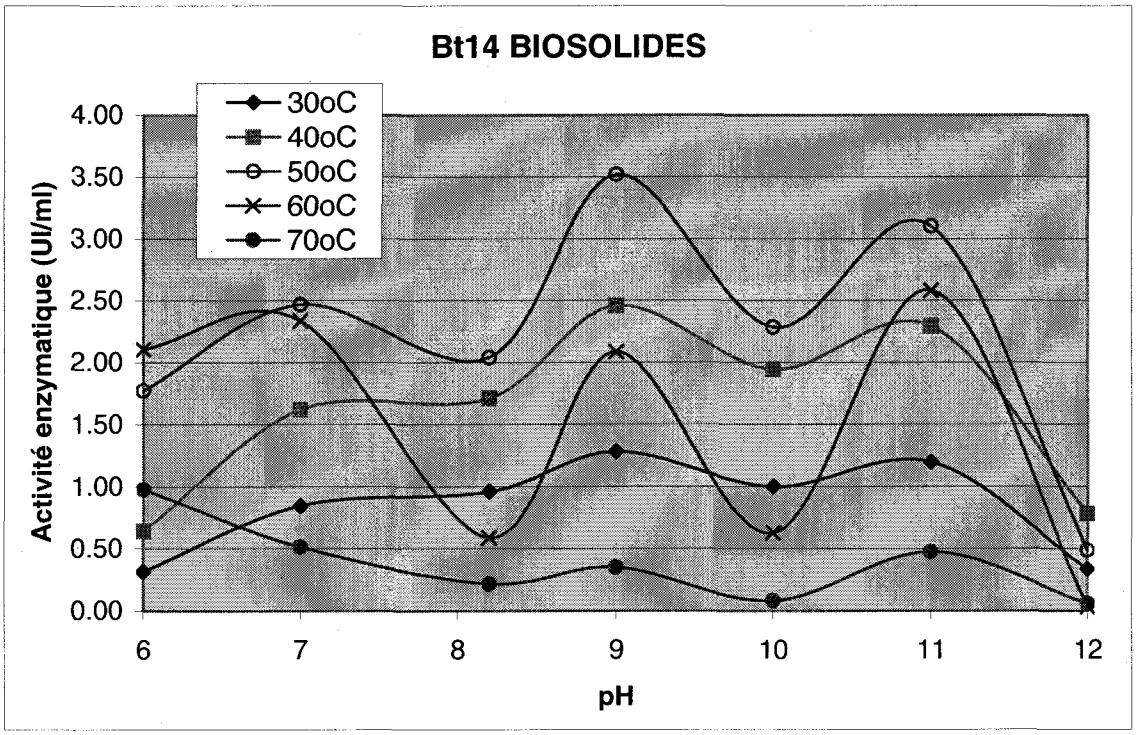
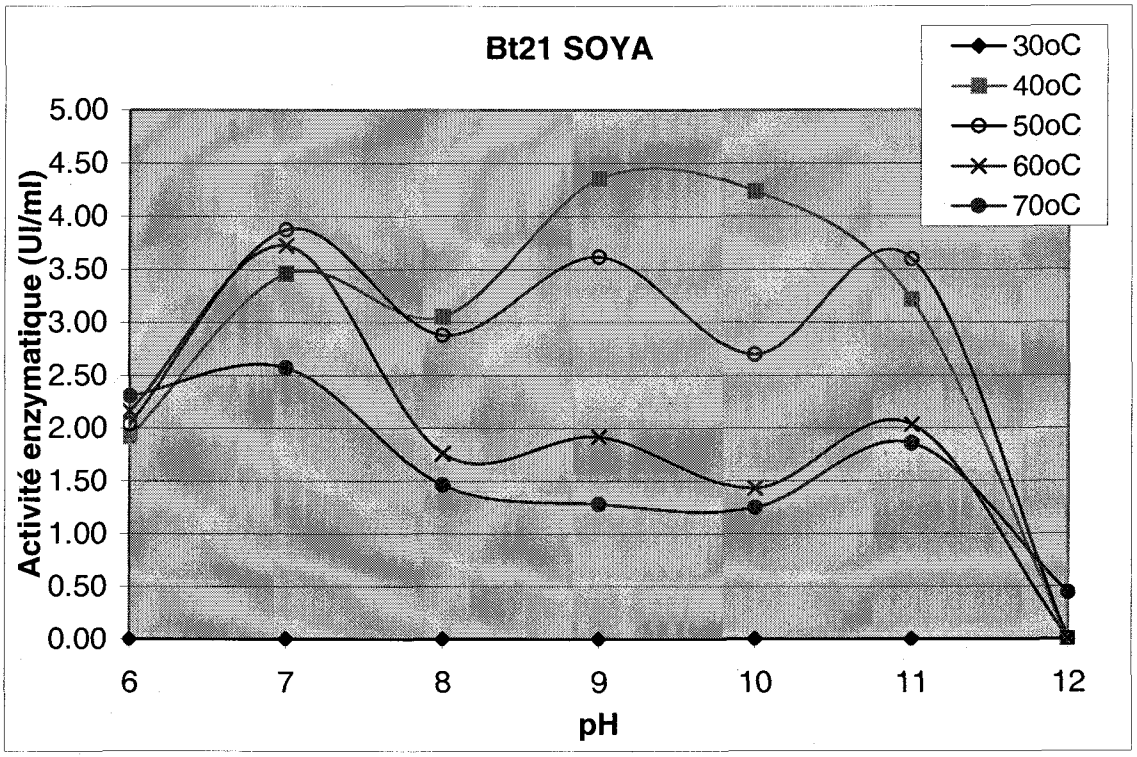


Figure 5e : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



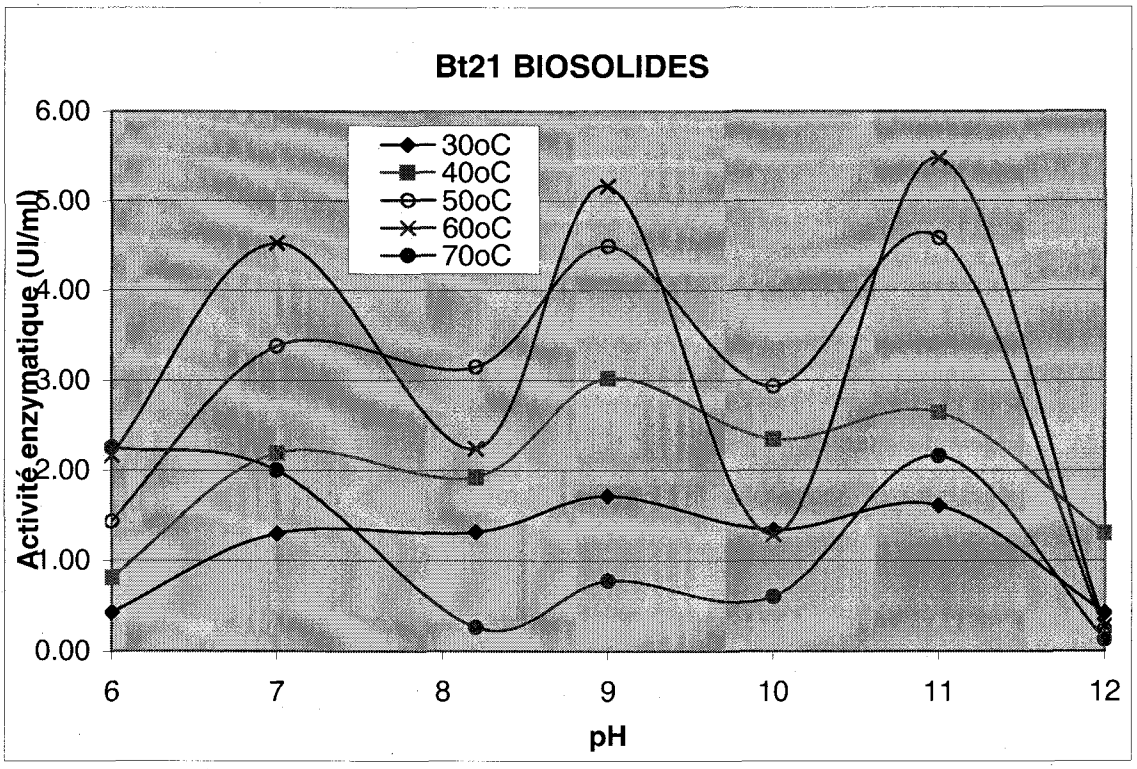
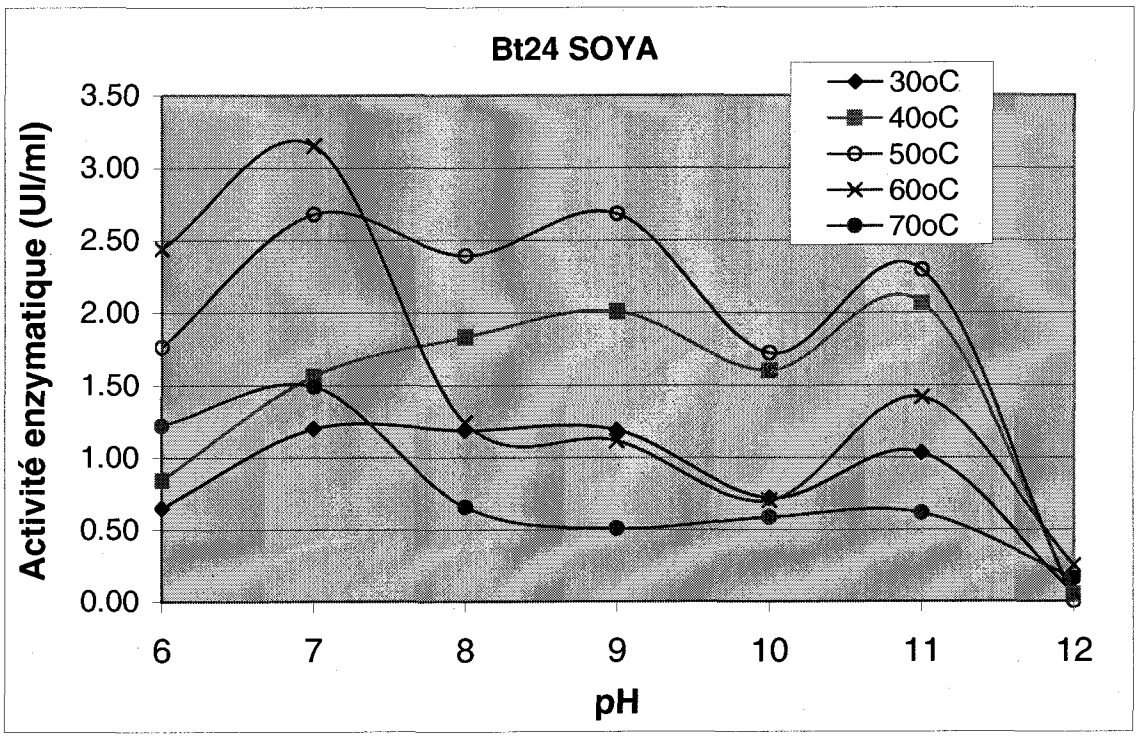


Figure 5f : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



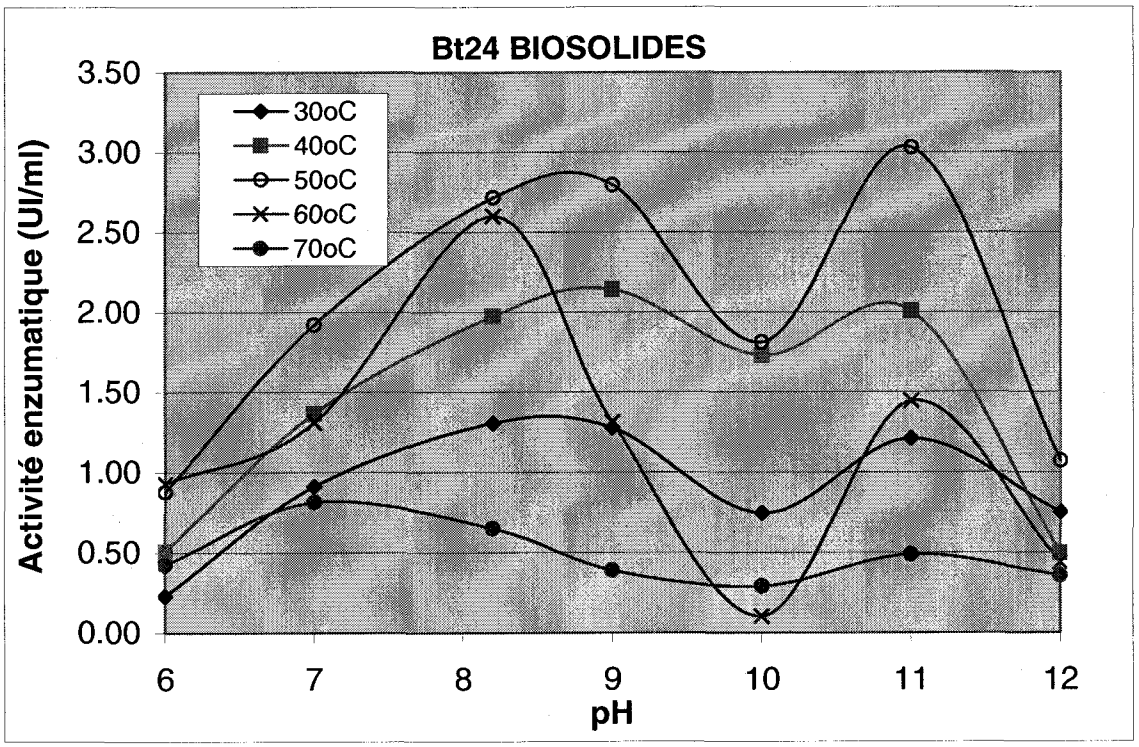
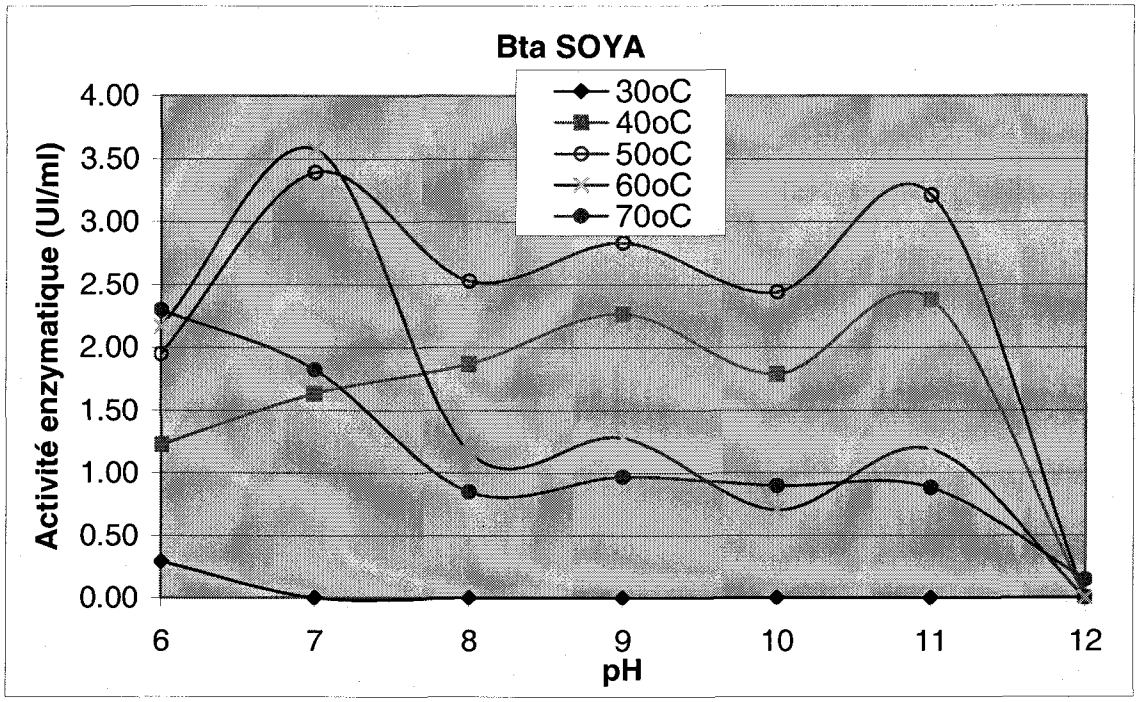


Figure 5g : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



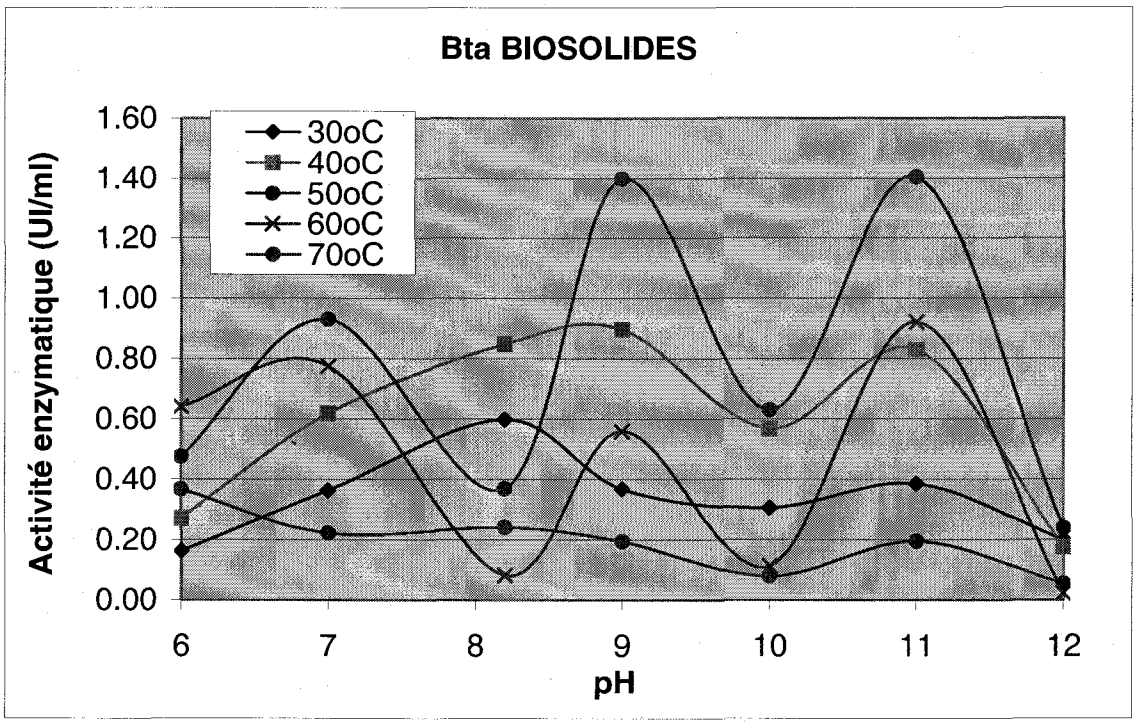
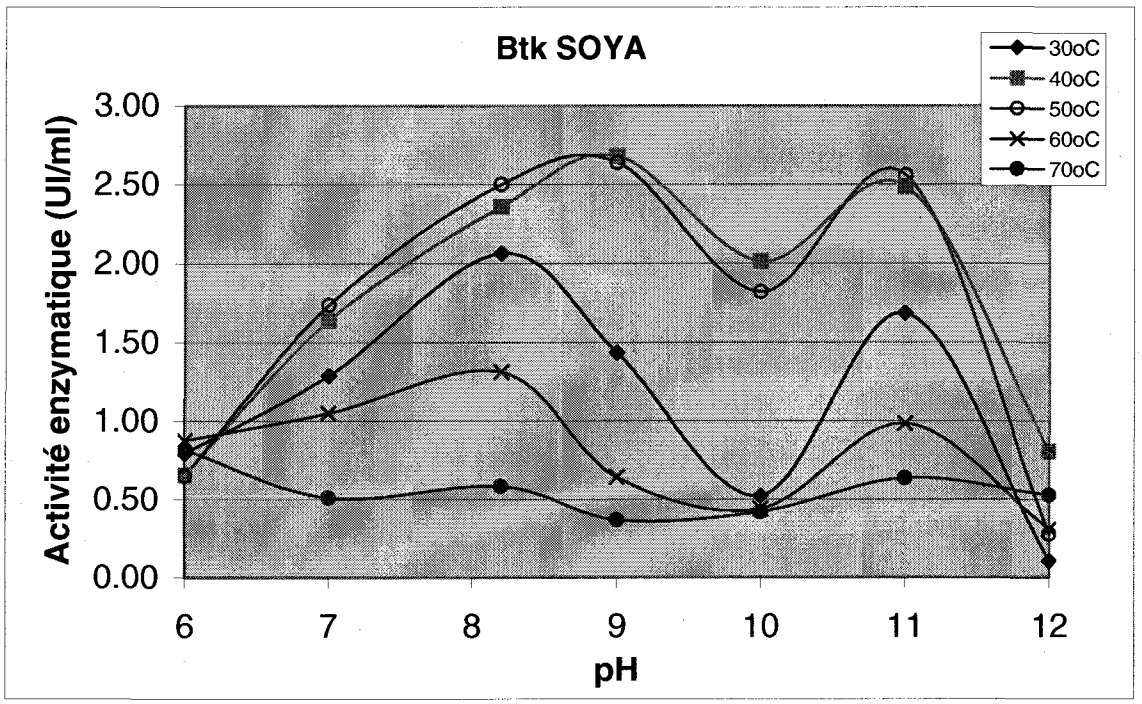


Figure 5h : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



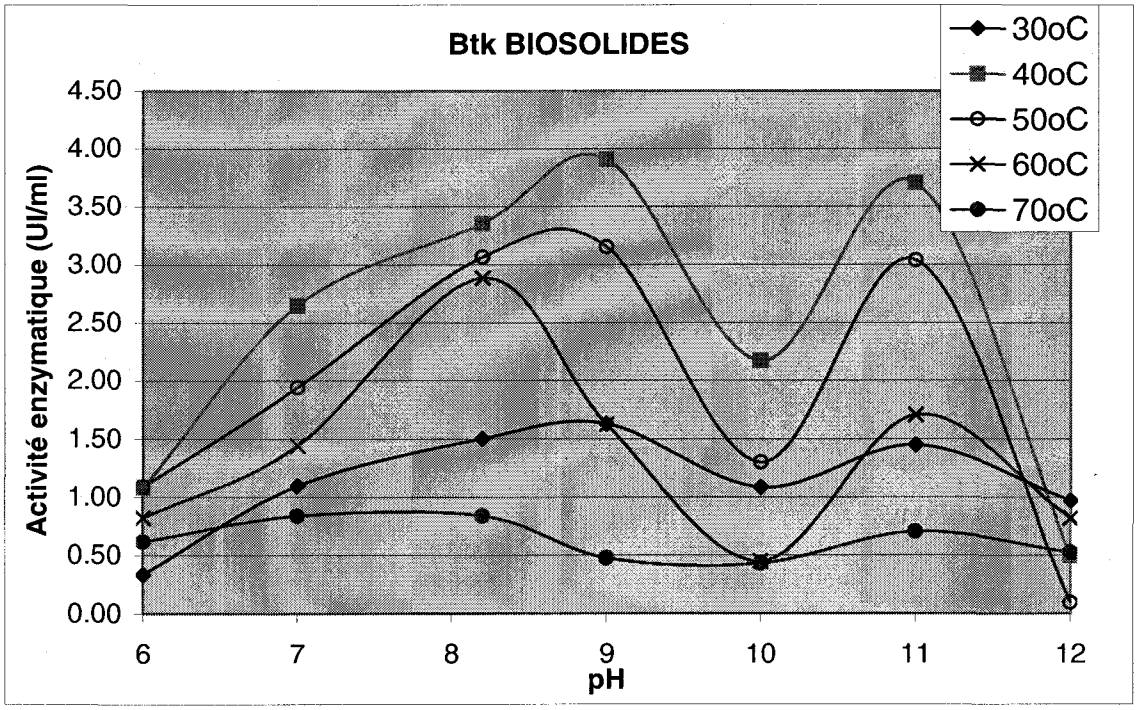


Figure 5i : Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Les résultats obtenus pour l'étude des effets de la température et du pH sur l'activité enzymatique varient d'une souche à l'autre, ce qui les rend difficiles à interpréter. Chacune des souches possèdent des caractéristiques propres quant aux propriétés de ses protéases. Contrairement à l'analyse de l'activité enzymatique, les résultats obtenus sont généralement plus élevés en biosolides. Il faut toutefois se rappeler que l'échantillon utilisé pour les tests de caractérisation est celui présentant l'activité enzymatique la plus élevée parmi les prélèvements effectués à 12, 24, 36 et 48 heures. L'échantillon sélectionné n'est souvent pas celui présentant l'activité enzymatique la plus élevée dans les graphiques de la Figure 4. Par exemple, pour la souche Bt6, l'échantillon sélectionné provient du prélèvement de 48 heures qui présente une activité enzymatique d'environ 0,5UI/ml, alors que le pic d'activité est de 3,5UI/ml après 9 heures de fermentation. Les résultats observés seront donc moins élevés que ceux obtenus grâce à un échantillon possédant une activité enzymatique plus élevée. Les résultats obtenus pour la souche Bt24 viennent supporter cette observation. Les échantillons pour le milieu soya et les biosolides possédaient sensiblement la même activité enzymatique, soit environ 2,25UI/ml. Les courbes obtenues en modifiant le pH et la température sont très semblables et présentent des pics aux mêmes endroits.

Il faut se rappeler que les conditions standards utilisées pour l'analyse de l'activité enzymatique, soit un pH de 8,2 et une température de 37°C, sont loin d'être les conditions optimales pour les protéases produites par Bt. Pour la majorité des souches, on observe des pics d'activité enzymatique aux pH 7 et entre 9 et 11. Ceci indique que Bt produit deux sortes de protéases; les protéases neutres possédant un pH optimum près de la neutralité et les protéases alcalines ayant un pH optimum entre 9 et 11. Cette hypothèse a déjà été formulées dans les travaux de Bibilos et Andrews, 1988; Zouari et Jaoua, 1999 et Tyagi *et al.*(2001). La majorité des souches présentent des pics d'activité enzymatique distincts à pH 9 et pH 11. Il se peut donc qu'il existe deux sortes de protéases alcalines au sein d'une même souche et que celles-ci possèdent un pH optimum différent. Les changements de température induisent aussi des différences entre les courbes. En général, les courbes pour les températures allant de 40 à 60°C sont les plus élevées. Une hausse de la température stimule les protéases, augmentant ainsi l'activité enzymatique. À 30°C, la

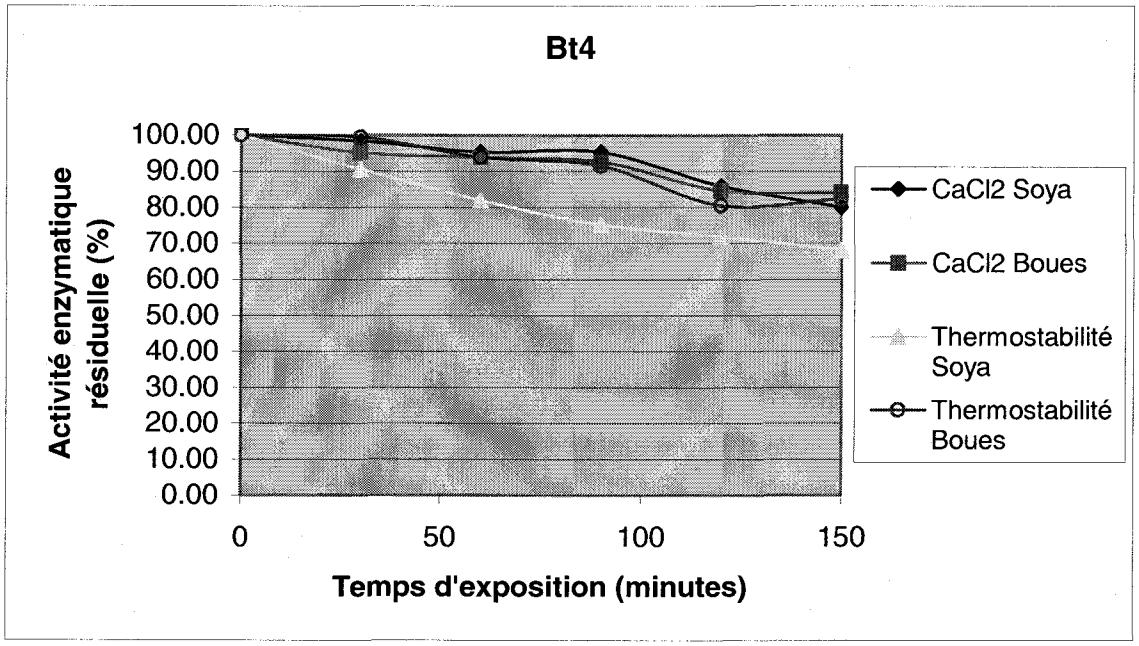
température est trop basse pour que l'activité enzymatique soit significative, alors qu'une température de 70°C est trop élevée et risque d'entraîner la dénaturation des protéases.

4.3.2 Thermostabilité et effets des ions Ca^{2+}

L'effet d'une exposition prolongée à la température est mesuré en incubant l'échantillon proprement dilué à 50°C pour une durée de 150 minutes, en effectuant des prélèvements aux 30 minutes. Cette température est utilisée, car elle correspond à la température optimale de Bt en ce qui concerne l'activité enzymatique. On peut par la suite procéder aux analyses d'activité enzymatique habituelles. Les résultats sont interprétés en termes d'activité enzymatique résiduelle, en se basant sur un échantillon n'ayant pas été exposé à la chaleur.

L'effet des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique est mesuré en mélangeant l'échantillon avec une solution de $CaCl_2$ 10 mM à un ratio 1/1. Ce mélange est incubé à 50°C pour une durée de 150 minutes, en effectuant des prélèvements aux 30 minutes. On peut par la suite procéder aux analyses d'activité enzymatique habituelles. Les résultats sont interprétés en termes d'activité enzymatique résiduelle, en se basant sur un échantillon n'ayant pas été exposé à la chaleur, mais ayant été mélangé à la solution de $CaCl_2$.

Les résultats obtenus (Figure 6) démontrent une bonne thermostabilité pour la plupart des souches de Bt étudiées. Pour quelques souches (Bt4, 8 et 12), toutes les courbes d'activité enzymatique se confondent, peu importe la présence ou non des ions Ca^{2+}. Il y a diminution graduelle, à mesure que le temps d'exposition augmente. On remarque un exception; la courbe d'activité enzymatique obtenue avec le Ca^{2+} en milieu soya pour la souche Bt24 diminue progressivement à 60% d'activité enzymatique résiduelle après 90 minutes pour ensuite augmenter jusqu'à 90% après 150 minutes. De manière générale, les résultats pour la thermostabilité en milieu soya sont toujours plus faibles que ceux observés avec les biosolides, avec seulement Bt21 comme exception. Les courbes d'activité enzymatique obtenues avec le Ca^{2+} sont également plus élevées en biosolides. Aussi, les courbes d'activité enzymatique en présence de Ca^{2+} sont toujours supérieures à celles obtenues pour la thermostabilité.



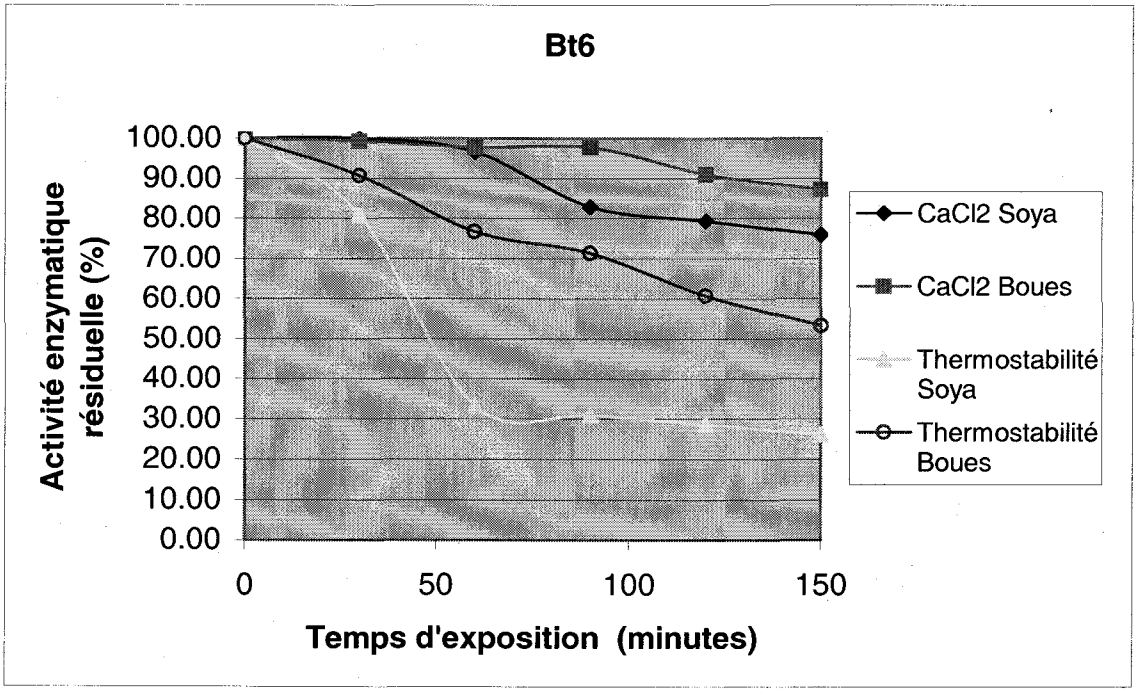
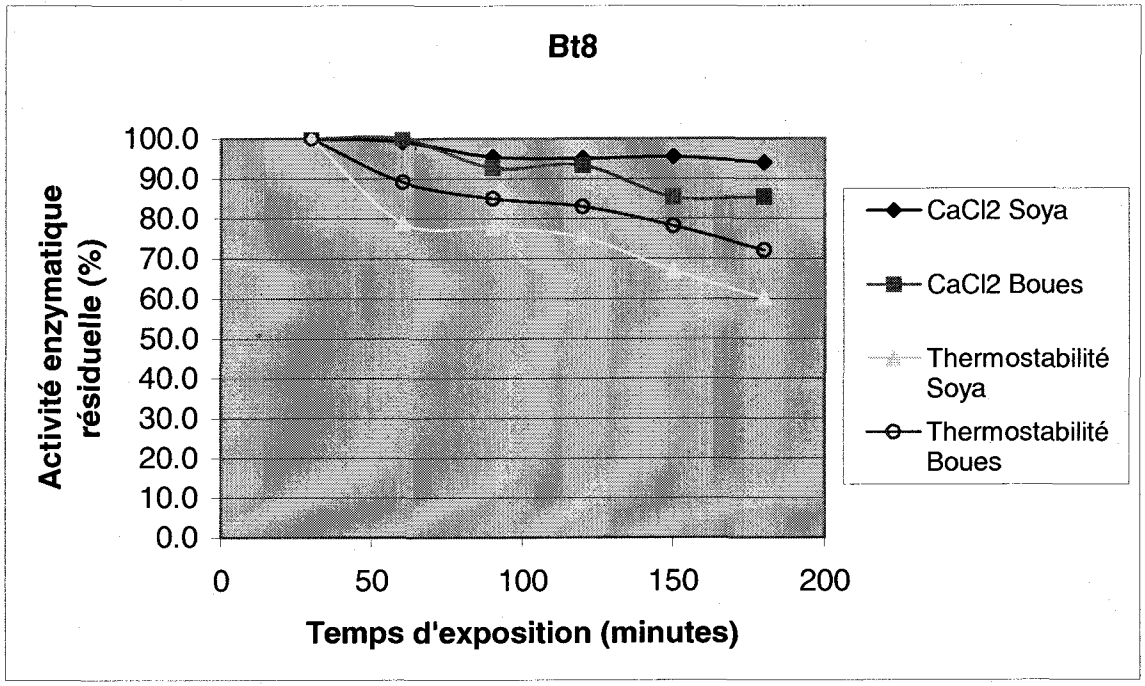


Figure 6a : Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



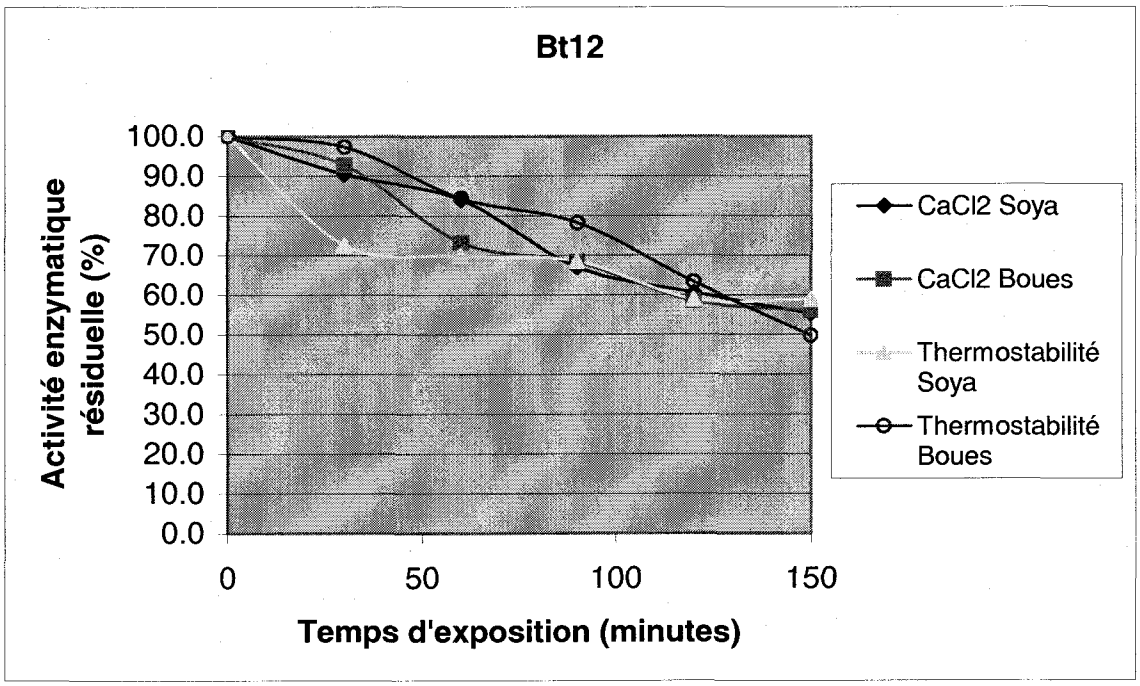
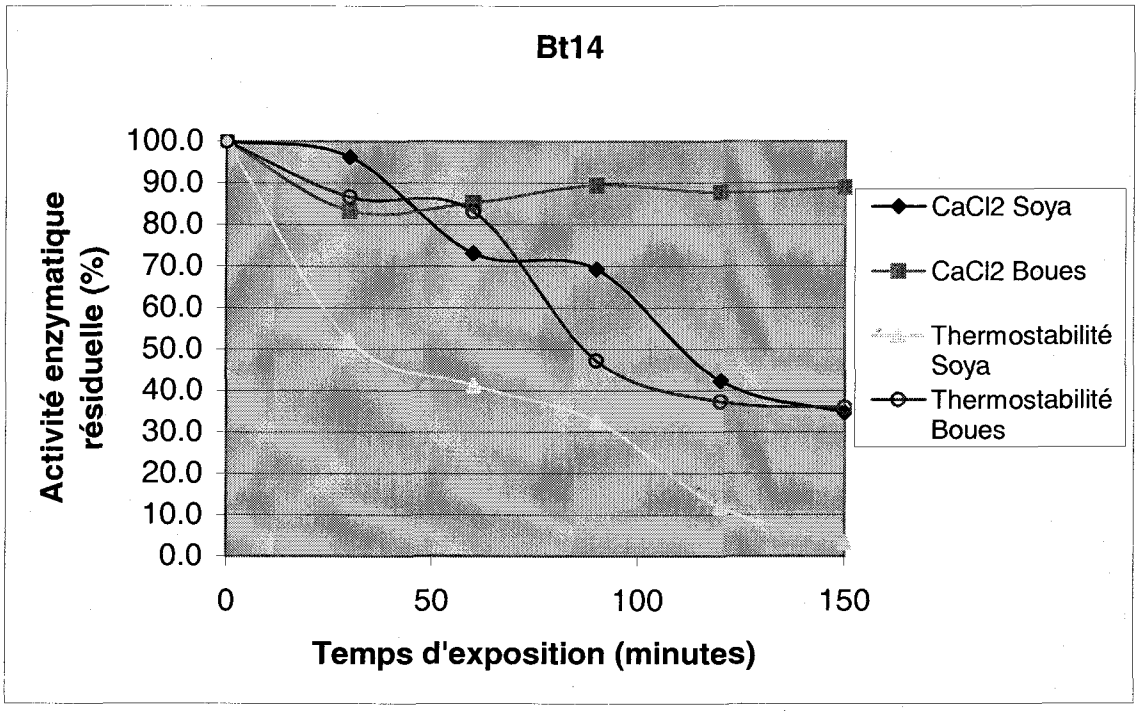


Figure 6b : Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



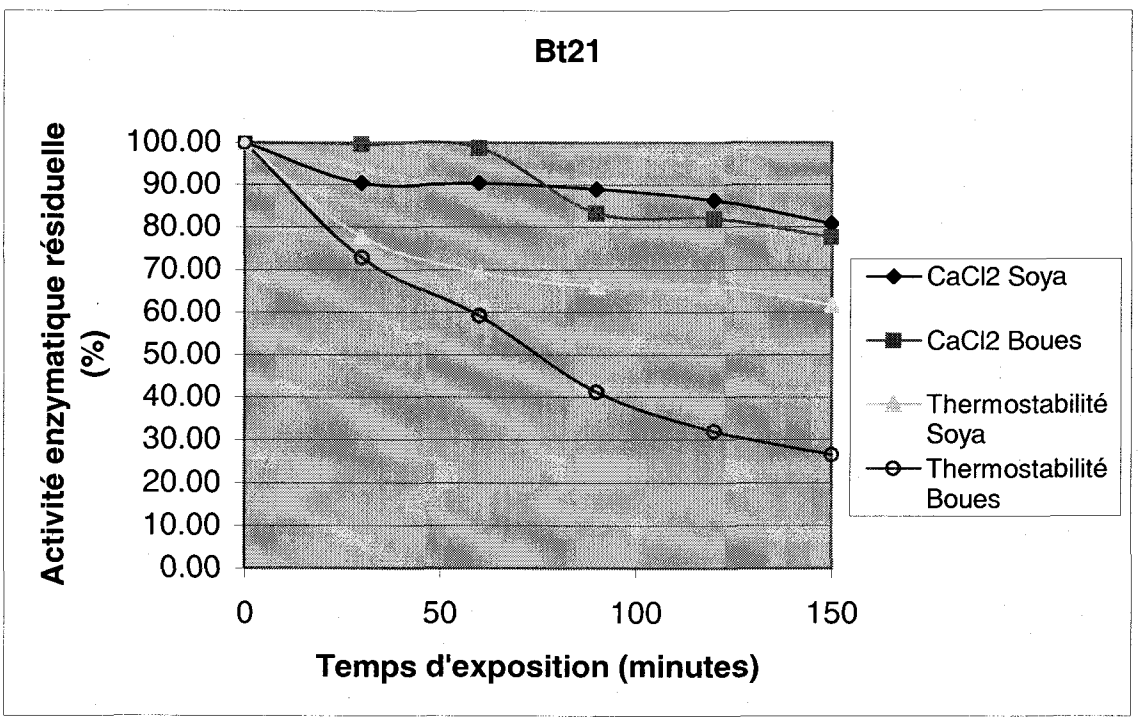
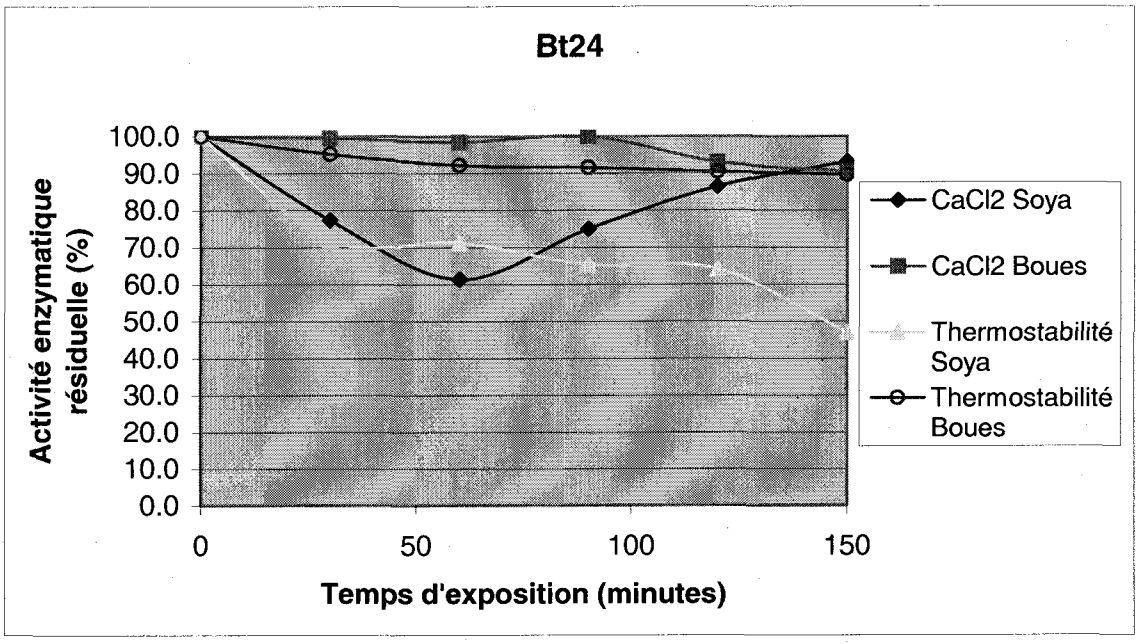


Figure 6c : Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



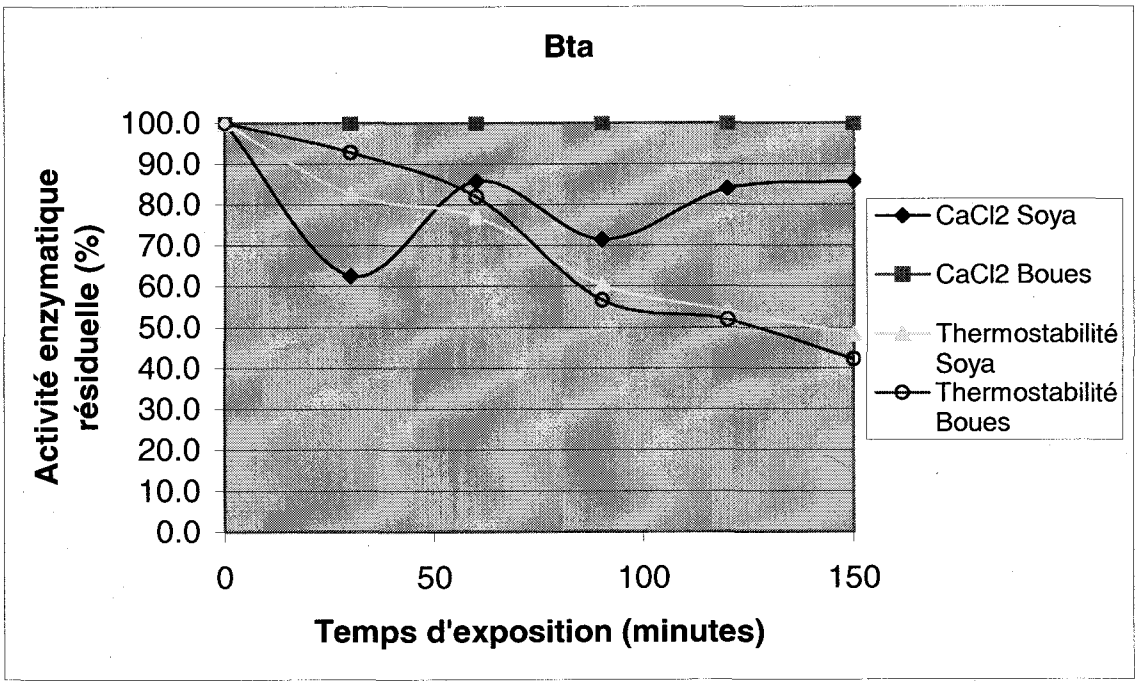


Figure 6d : Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

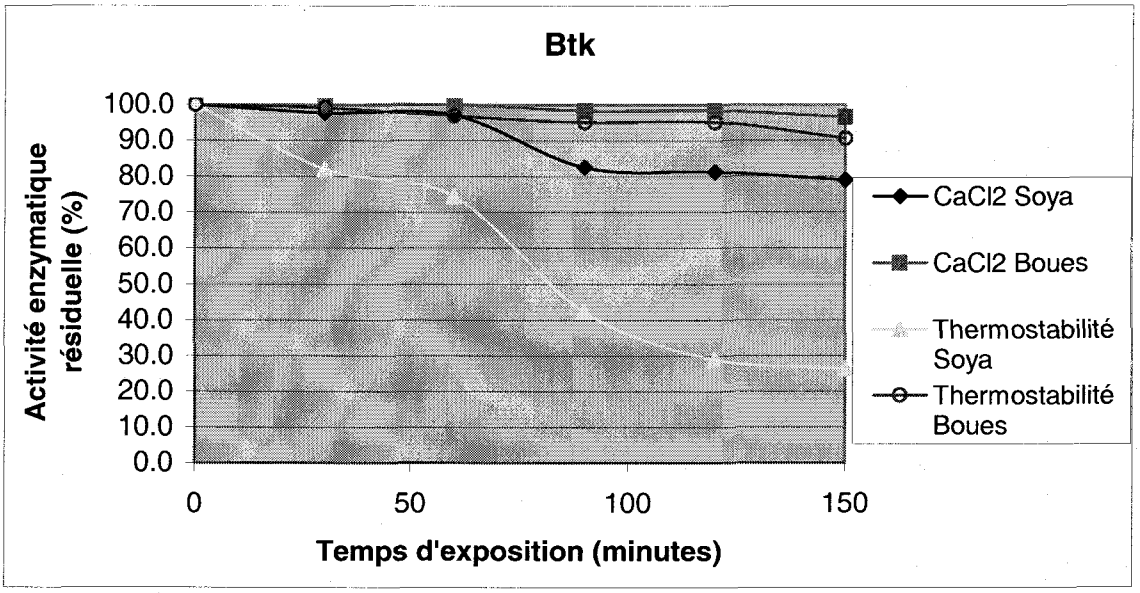


Figure 6e : Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

La thermostabilité des protéases est importante d'un point de vue commercial puisqu'elles doivent stables à température élevée, particulièrement dans les détergents, puisque la lessive requiert généralement de l'eau chaude. De nombreux auteurs ont démontré la thermostabilité des protéases produites par les espèces de *Bacillus* (Takami *et al.*, 1989; Raham *et al.*, 1994; Ferrero *et al.*, 1996; Zouari et Jaoua, 1999; Tyagi *et al.*, 2001; Kumar, 2002). Les résultats de thermostabilité sont intéressants pour la plupart des souches. La majorité d'entre elles perdent environ 20% de leur activité enzymatique en 30 minutes, mais ne sont jamais complètement inactivées après 150 minutes. On remarque une différence plutôt marquée entre le milieu soya et les biosolides. En général, les courbes de thermostabilité de l'activité enzymatique sont plus élevées si la fermentation est faite en biosolides, plutôt qu'en milieu soya. Les souches de Bt produisent des protéases plus thermostables lorsqu'elles sont cultivées dans les biosolides. Ceci pourrait être dû au fait que les nouvelles souches de Bt sont isolées de biosolides, mais on observe le même phénomène chez la souche de référence Btk. Seules les caractéristiques du milieu peuvent expliquer le phénomène.

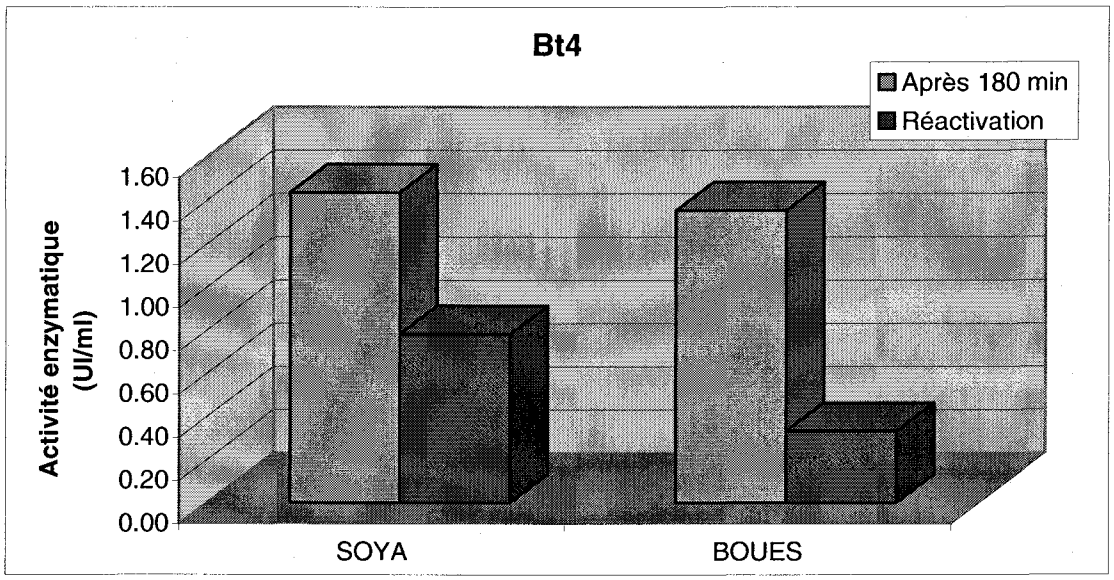
Les ions métalliques Ca^{2+} et Mg^{2+} permettent de stabiliser les enzymes en agissant directement sur le site actif des métalloprotéases. L'ajout d'ions Ca^{2+} à l'échantillon avant l'exposition à une température élevée et prolongée permet de vérifier la présence de métalloprotéases parmi les protéases. Les métalloprotéases requièrent un ion métallique pour être stables. De nombreuses études ont démontrées que l'ajout d'ions métalliques stabilisait l'activité enzymatique à température élevée (Li et Yousten, 1975; Takami *et al.*, 1989; Raham *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Secades et Guijarro, 1999; Kerovuo *et al.*, 2000; Tyagi *et al.*, 2001; Kumar, 2002). Les résultats obtenus révèlent une stabilité accrue lors de la présence d'ions Ca^{2+}. L'activité enzymatique reste constante tout au long de l'exposition et la plupart ont perdu moins de 20% de leur activité enzymatique après 150 minutes, indiquant ainsi qu'une grande proportion des protéases produites par les souches sont des métalloprotéases. Comme pour la thermostabilité, les courbes obtenues en biosolides sont plus élevées qu'en milieu soya. Encore une fois, seules les caractéristiques du milieu peuvent expliquer la différence entre les courbes.

4.3.3 Réactivation

L'étude du phénomène de réactivation est effectuée en exposant l'échantillon non dilué à une température de 50°C pendant 180 minutes. Cette température est utilisée, car elle correspond à la température optimale de Bt. On mélange ensuite l'échantillon à une solution de $CaCl_2$ 10mM à un ratio 1/1. Le mélange échantillon-$CaCl_2$ est finalement incubé une heure à 50°C. On peut par la suite procéder aux analyses d'activité enzymatique habituelles. Les résultats sont interprétés par rapport à un échantillon n'ayant pas été exposé aux ions Ca^{2+}.

Les résultats obtenus (Figure 7) sont très partagés, selon la souche étudiée et la nature du milieu utilisé. Les souches Bt4, 8, 21, 24 et k ne démontrent aucun phénomène de réactivation dans chacun des deux milieux. On observe un peu de réactivation pour Bt6, mais dans le milieu soya seulement. Le même phénomène est présent pour Bt12 et a, mais dans avec les biosolides cette fois-ci. Pour ce qui est de Bt14, le phénomène de réactivation est observé dans les deux milieux, mais dans des proportions très différentes. En effet, on remarque un phénomène de réactivation beaucoup plus important dans le

milieu soya qu'avec les biosolides. Il est important de souligner la très faible activité enzymatique mesurée pour toutes les souches, à l'exception de Bt21, qui pourrait rendre difficile l'interprétation des résultats.



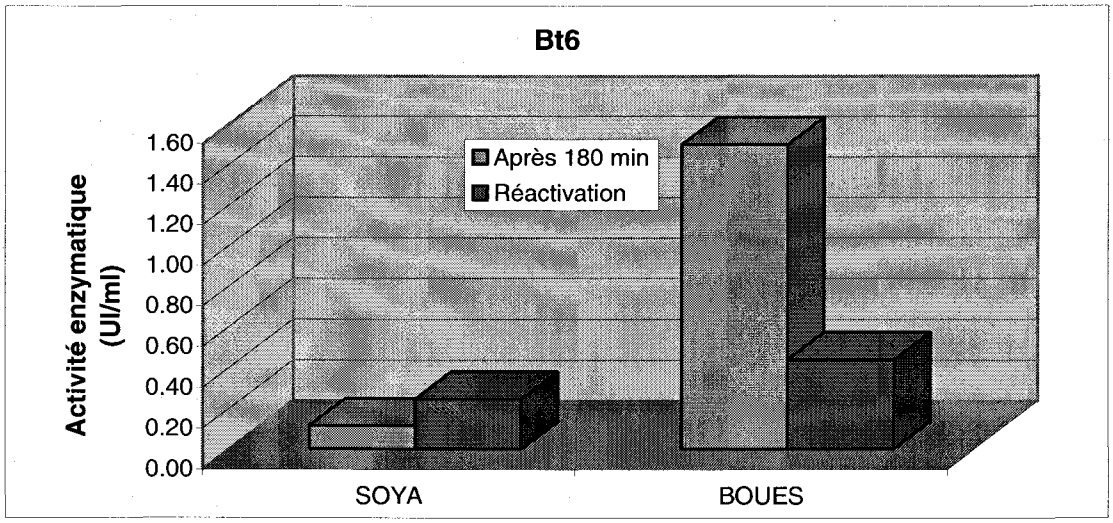
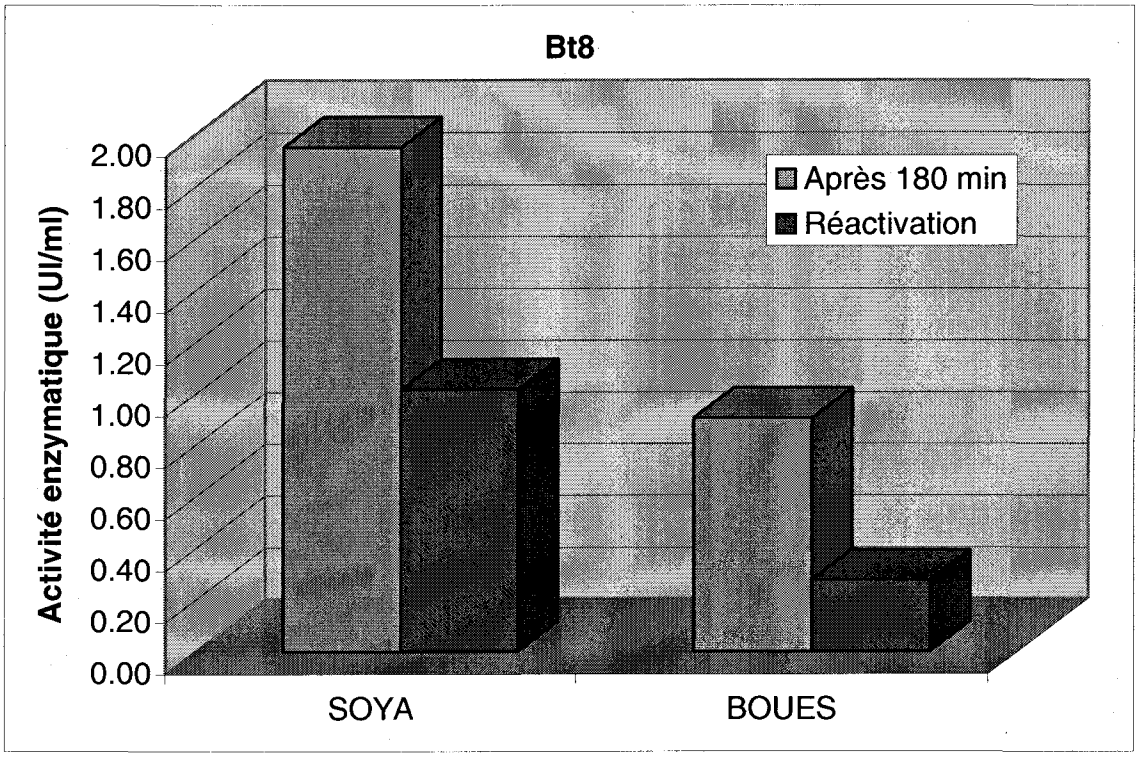


Figure 7a : Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



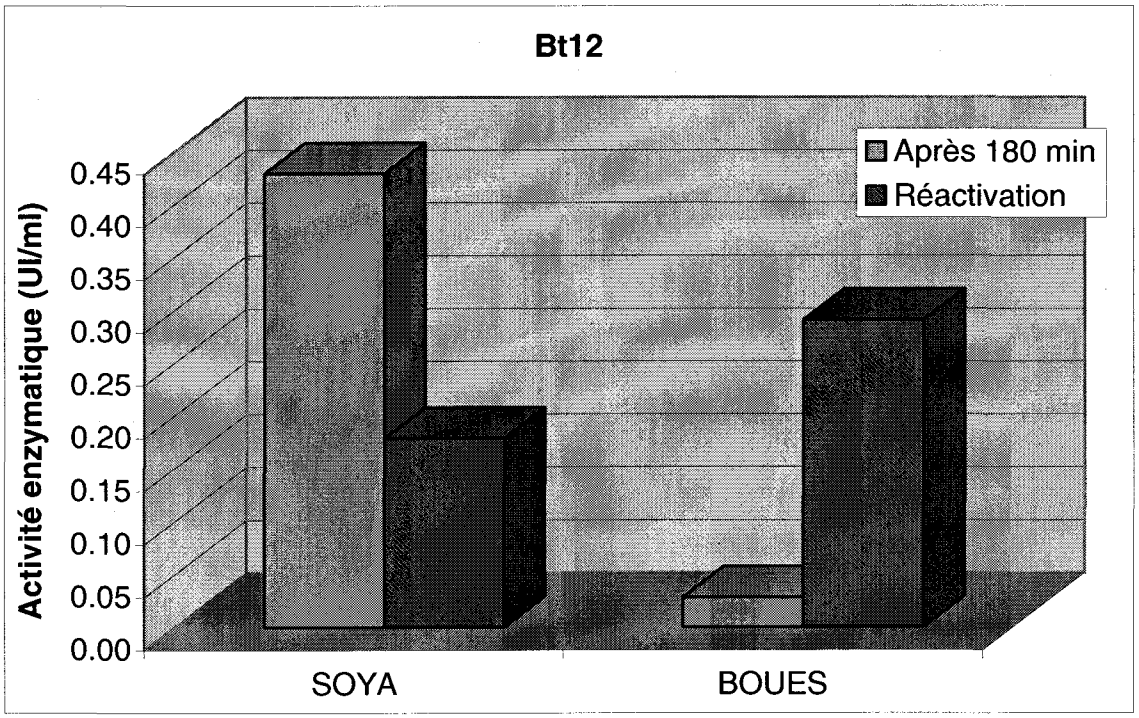
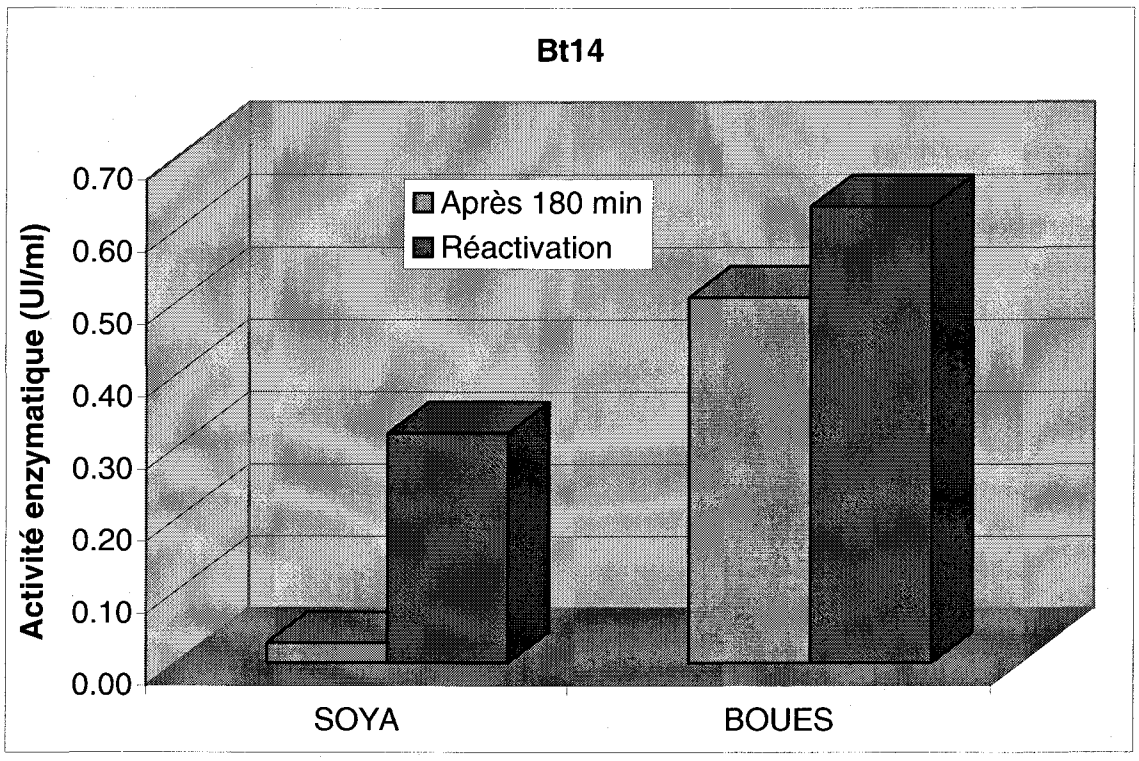


Figure 7b : Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



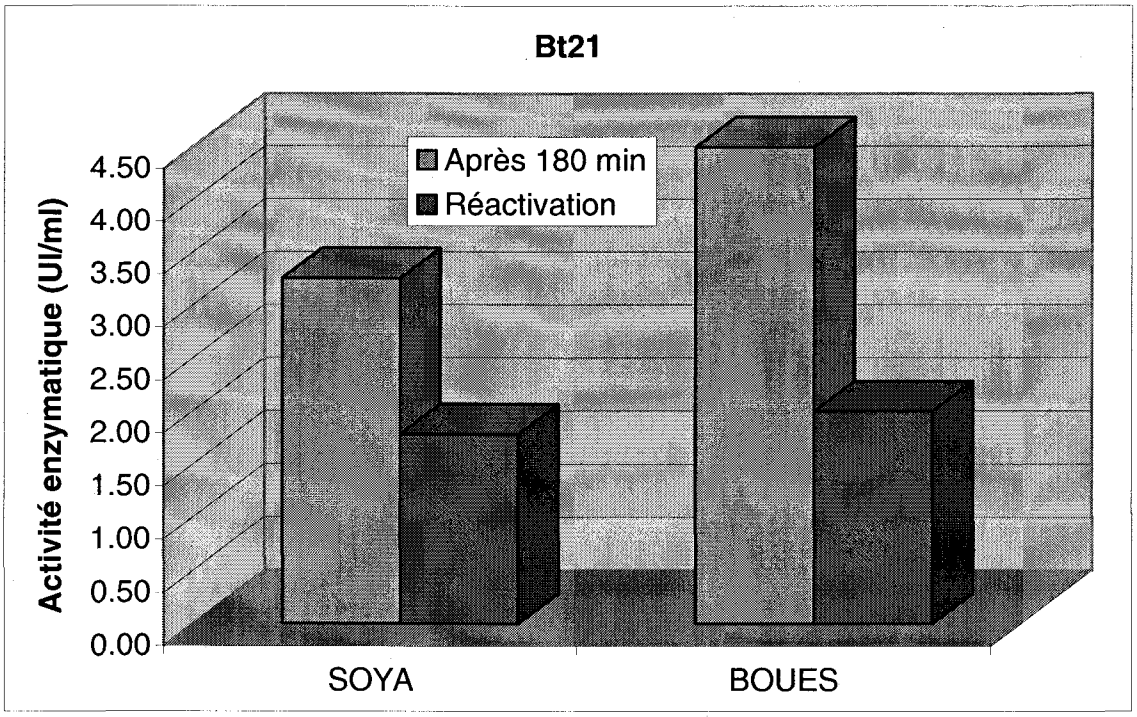
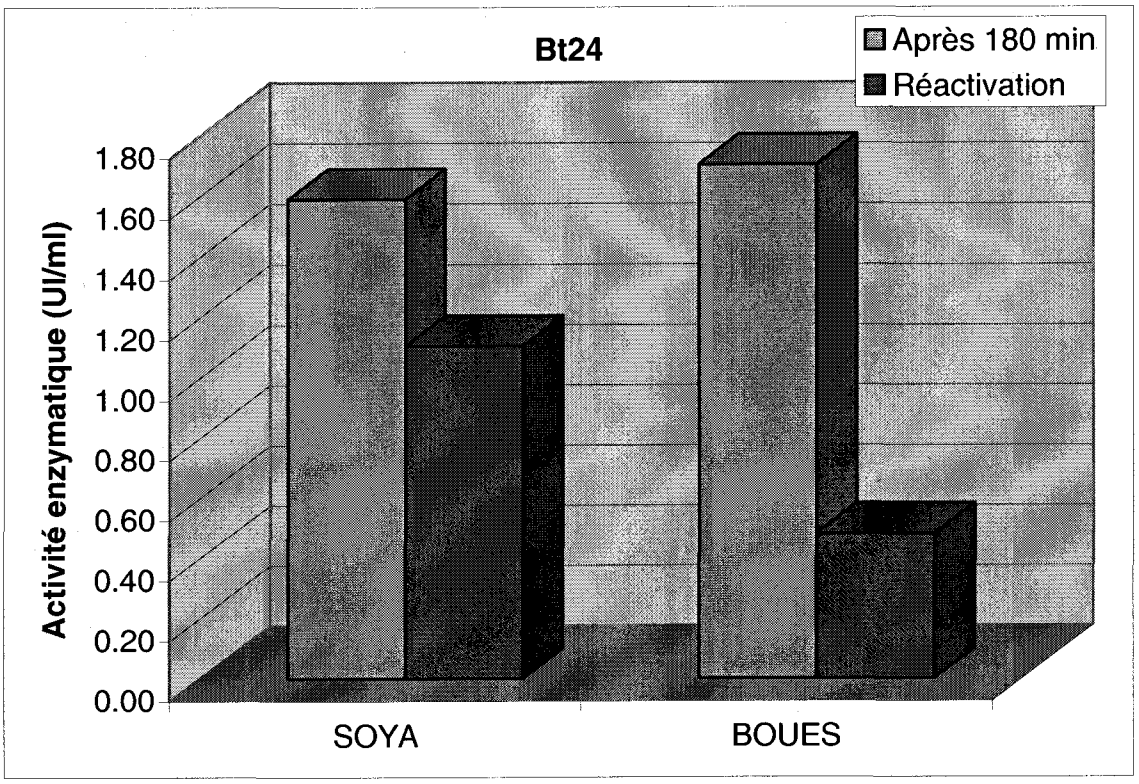


Figure 7c : Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.



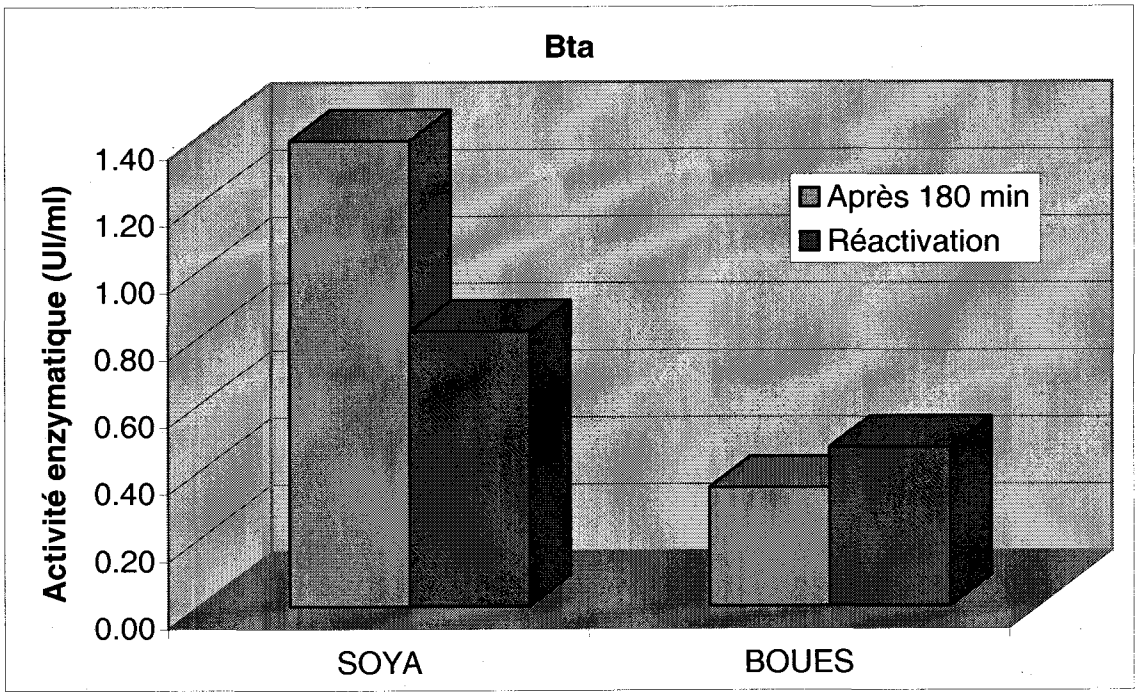


Figure 7d : Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

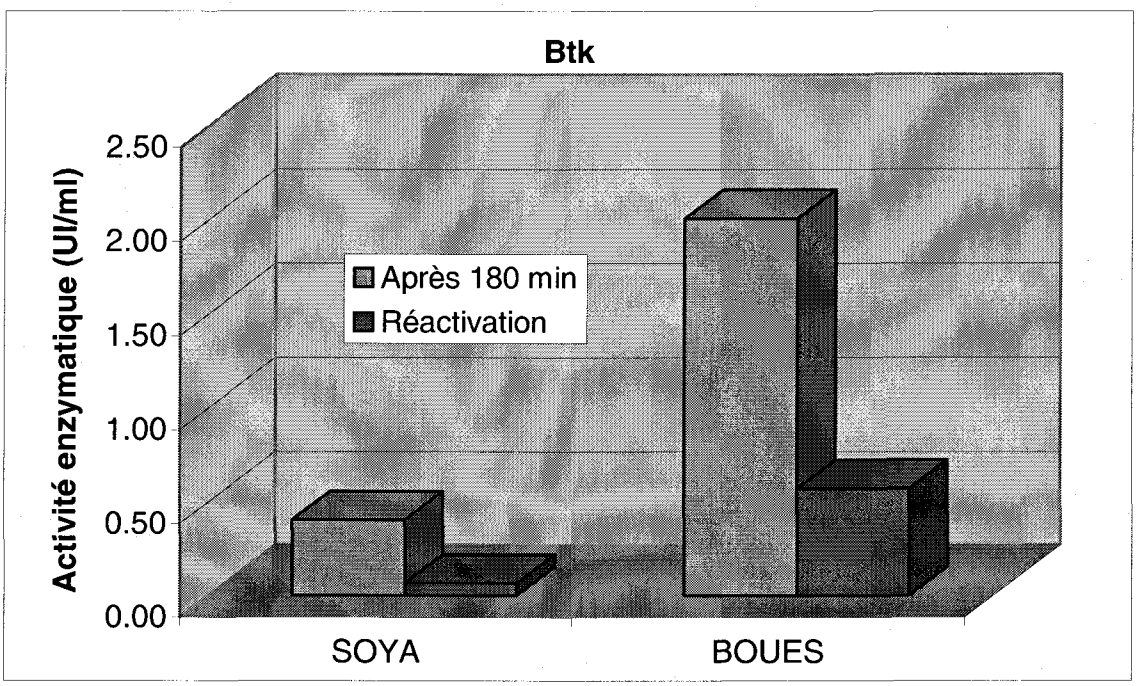


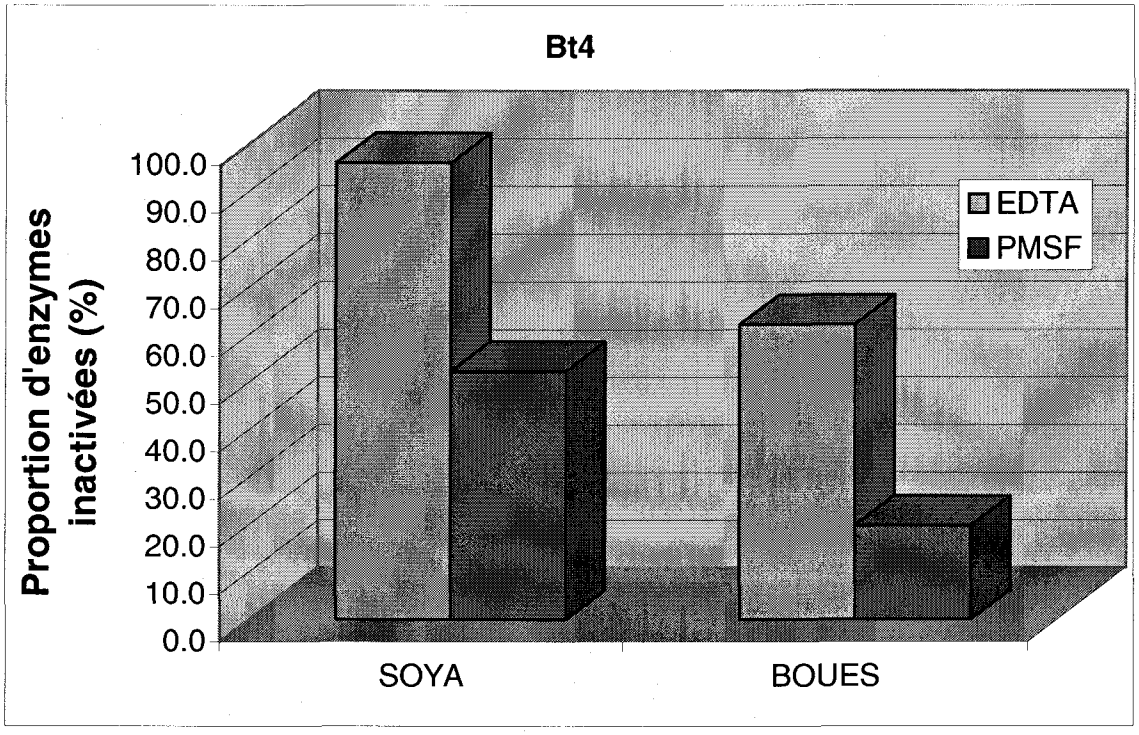
Figure 7e : Étude du phénomène de réactivation chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

Certaines protéases peuvent être réactivées après avoir été inactivées par la chaleur, grâce à l'addition d'ions Ca^{2+}. Après avoir été affectés par une température de 50°C pendant 150 minutes, les échantillons sont mélangés avec une solution de $CaCl_2$ 10mM à un ratio 1/1. Les résultats obtenus sont plutôt difficiles à interpréter puisque les valeurs d'activité enzymatique sont très faibles. Ceci s'explique par le fait que les échantillons ont été exposés à la chaleur pendant assez de temps pour inactiver grandement les protéases. Toutefois, on remarque généralement que les souches étudiées n'ont pas été réactivées par l'addition de $CaCl_2$. Les seules souches démontrant un phénomène de réactivation (Bt12 et Bt14) ont une activité enzymatique extrêmement faible, il est donc difficile de tirer des conclusions. Par contre, pour la plupart des souches, les résultats sont comparables dans les deux milieux de culture dans des proportions semblables, c'est-à-dire que l'absence de réactivation est similaire. Les études de Stefanisti *et al.*(1995); portant sur la réactivation indiques que les protéases inactivées subissent une dénaturation irréversible qui empêche la réactivation.

4.3.4 Inhibiteurs de protéases (PMSF et EDTA)

L'étude de l'effet des inhibiteurs de protéases est effectuée en mélangeant l'échantillon non dilué avec chacune des solutions d'inhibiteurs (PMSF et EDTA). Chaque solution d'inhibiteur est à une concentration de 2mM et le mélange est effectué à un ratio de 1/1. Le mélange échantillon-inhibiteur est par la suite incubé à 37°C pendant 15 minutes. On peut par la suite procéder aux analyses d'activité enzymatique habituelles. Les résultats sont interprétés en termes de proportion d'enzymes inactivées, en se basant sur un échantillon n'ayant pas été exposé aux inhibiteurs.

Les résultats obtenus (Figure 8) varient selon la souche de bactérie et la nature du milieu utilisé. On remarque une tendance très prononcée; l'EDTA inactive fortement les protéases. En effet, on observe toujours une inhibition de plus de 70% des enzymes, parfois même une inhibition presque totale. L'inhibition est beaucoup moins importante en ce qui concerne le PMSF, elle est parfois inexistante. De manière générale, la proportion d'enzymes inactivées est plus prononcée dans le milieu soya qu'avec les biosolides. On remarque aussi que le pourcentage combiné des enzymes inactivées par le PMSF et l'EDTA excède souvent 100%.



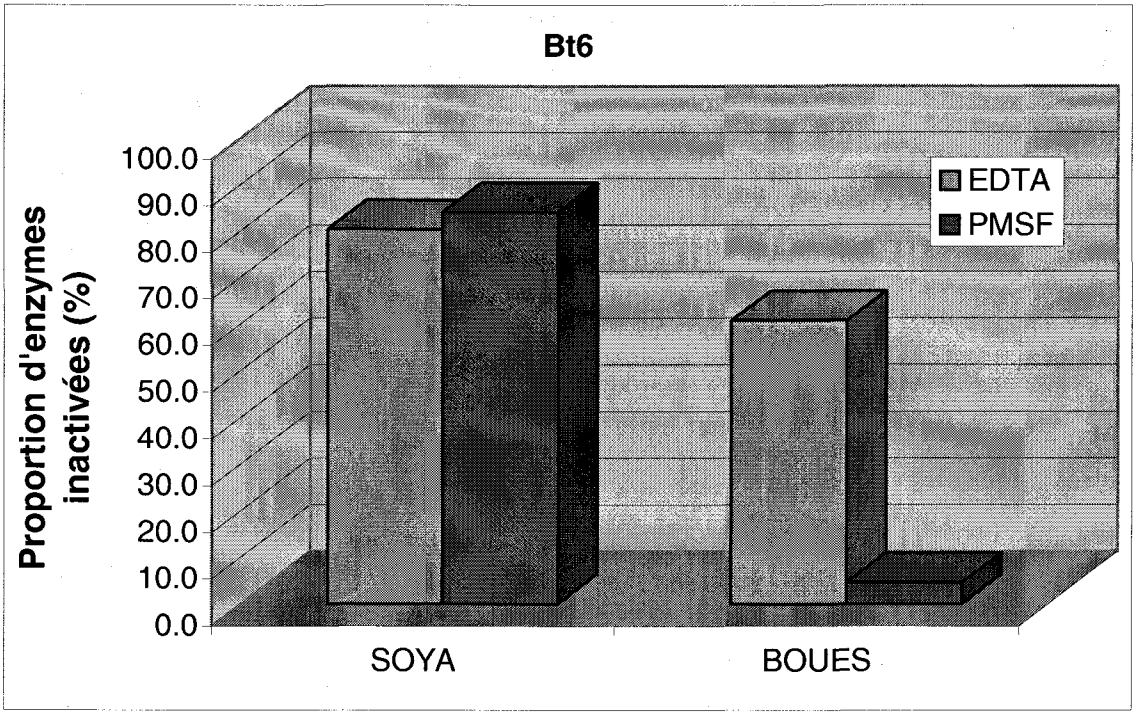
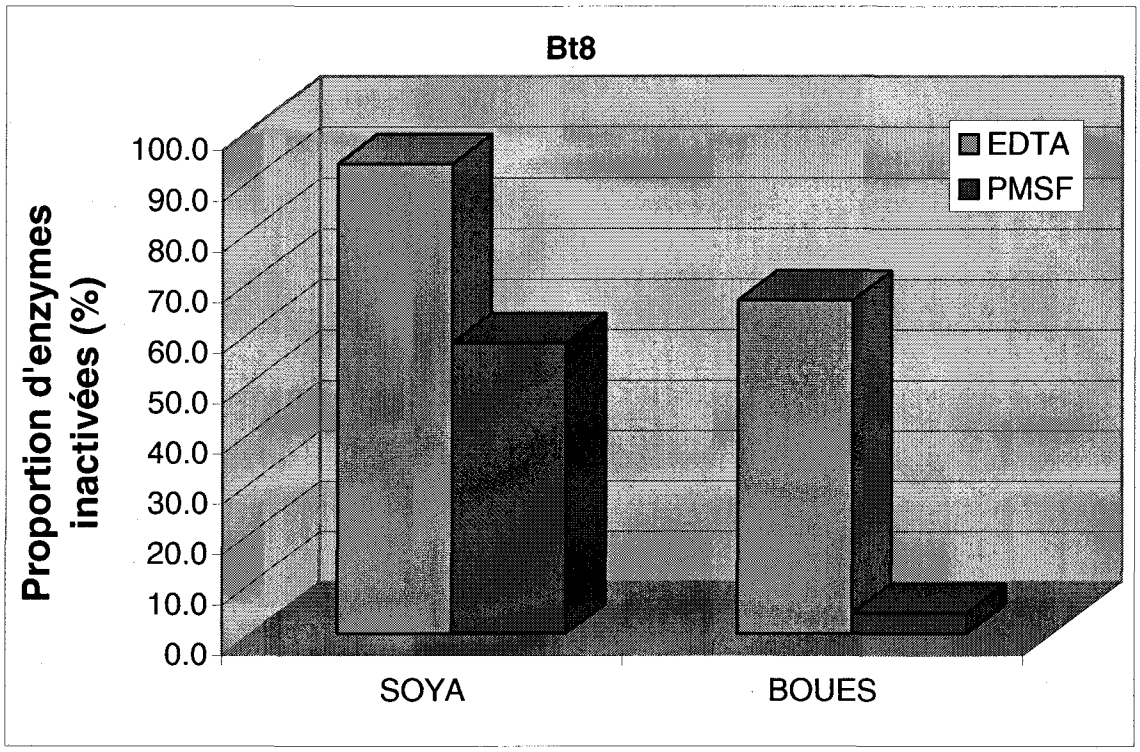


Figure 8a : Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



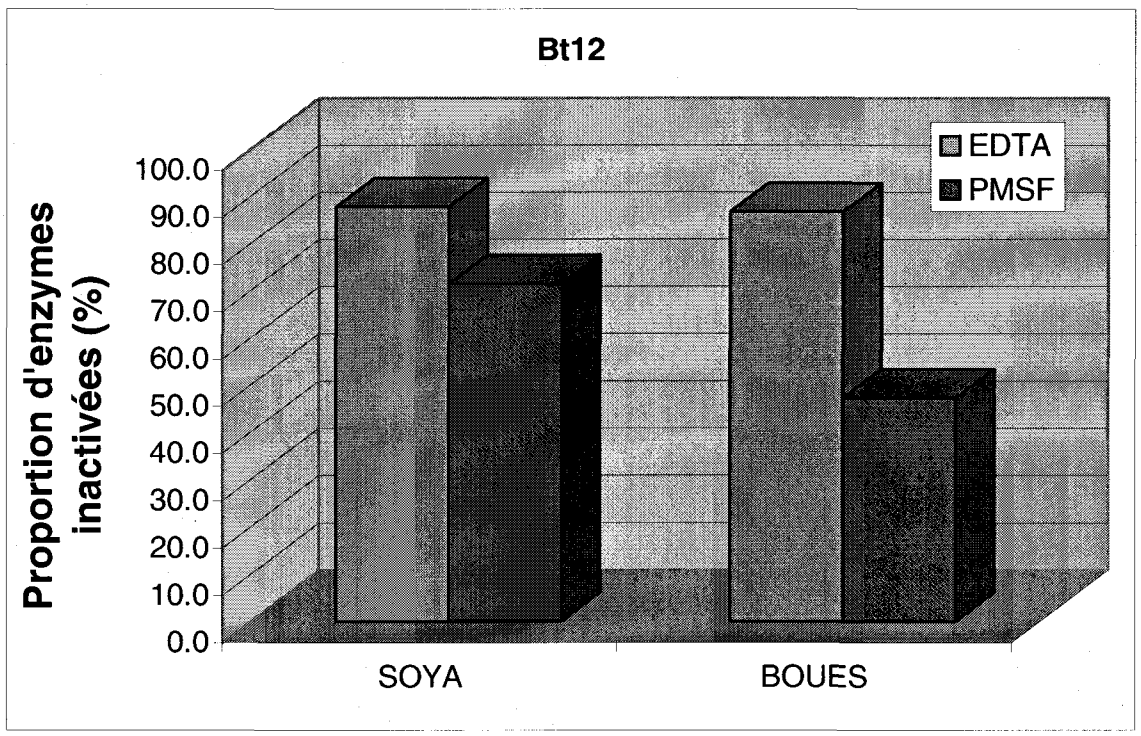
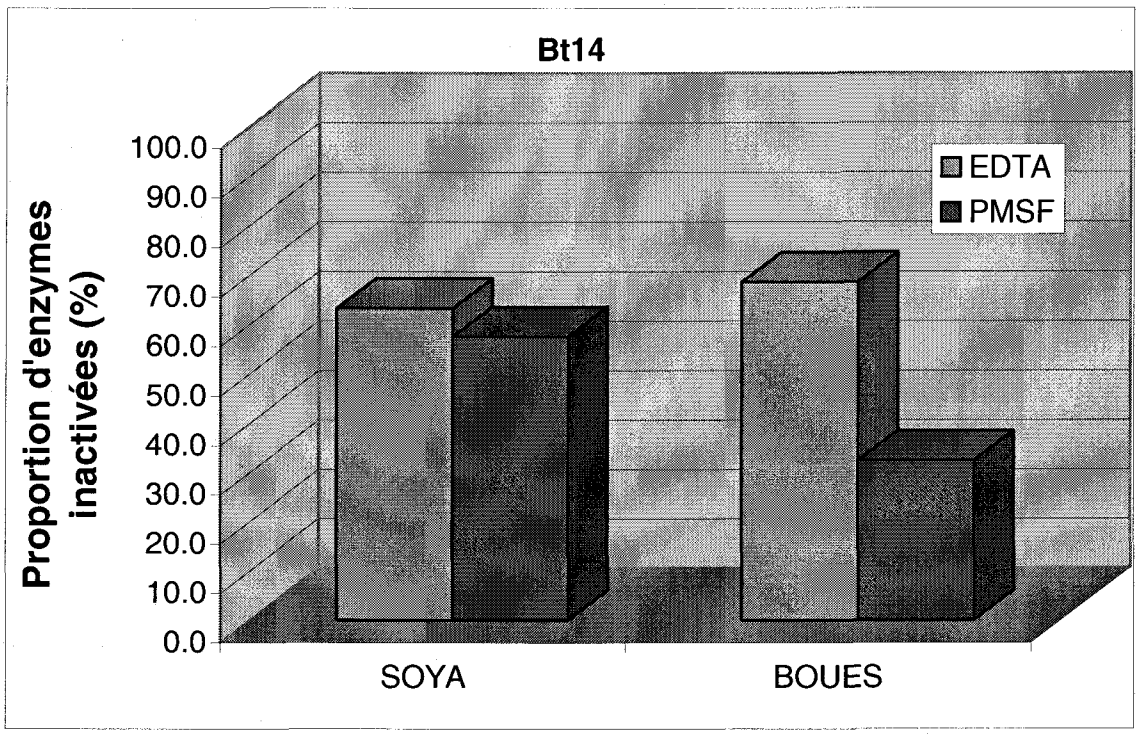


Figure 8b : Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



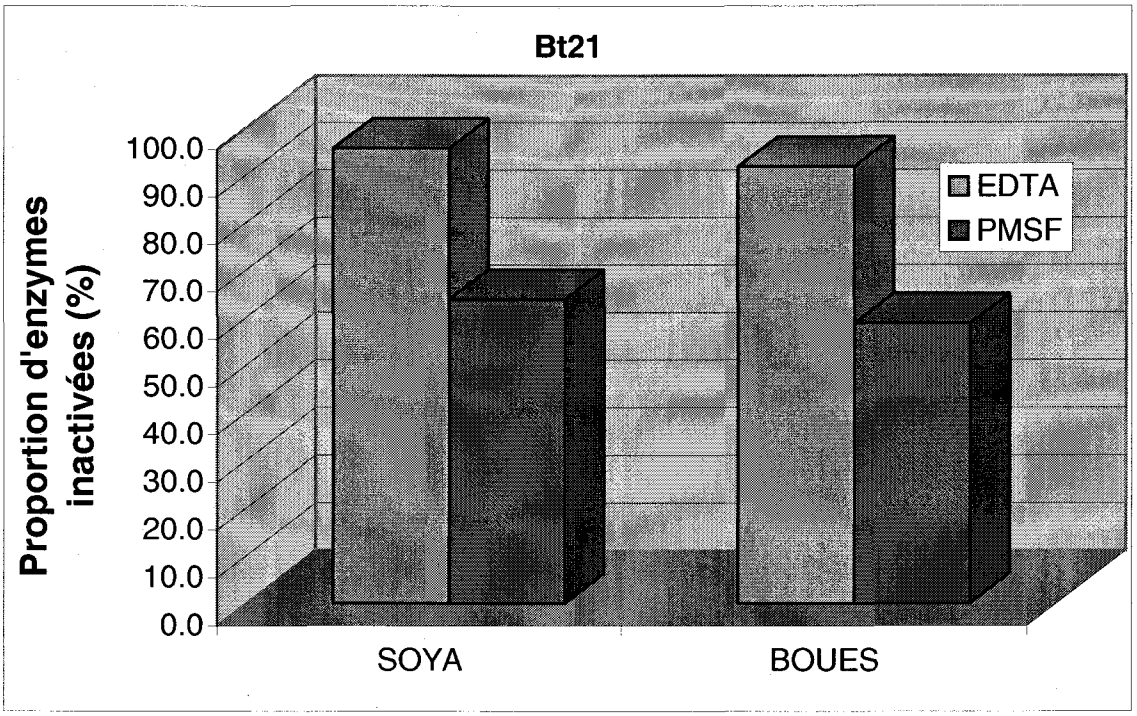
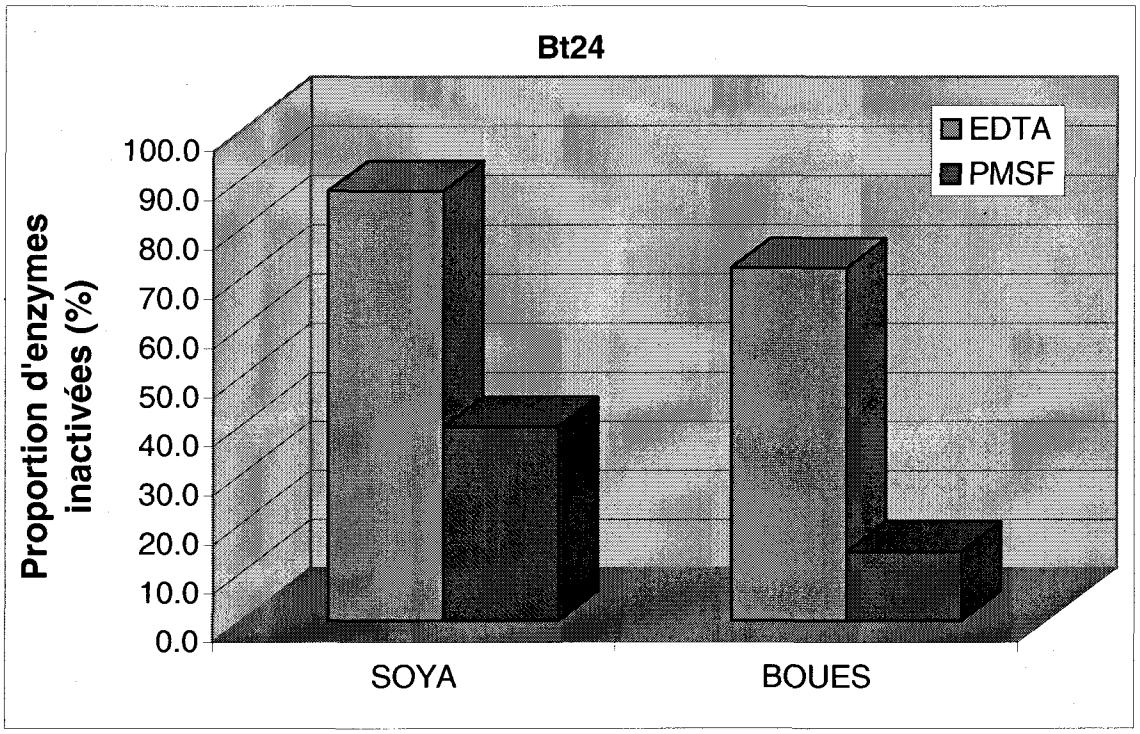


Figure 8c : Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.



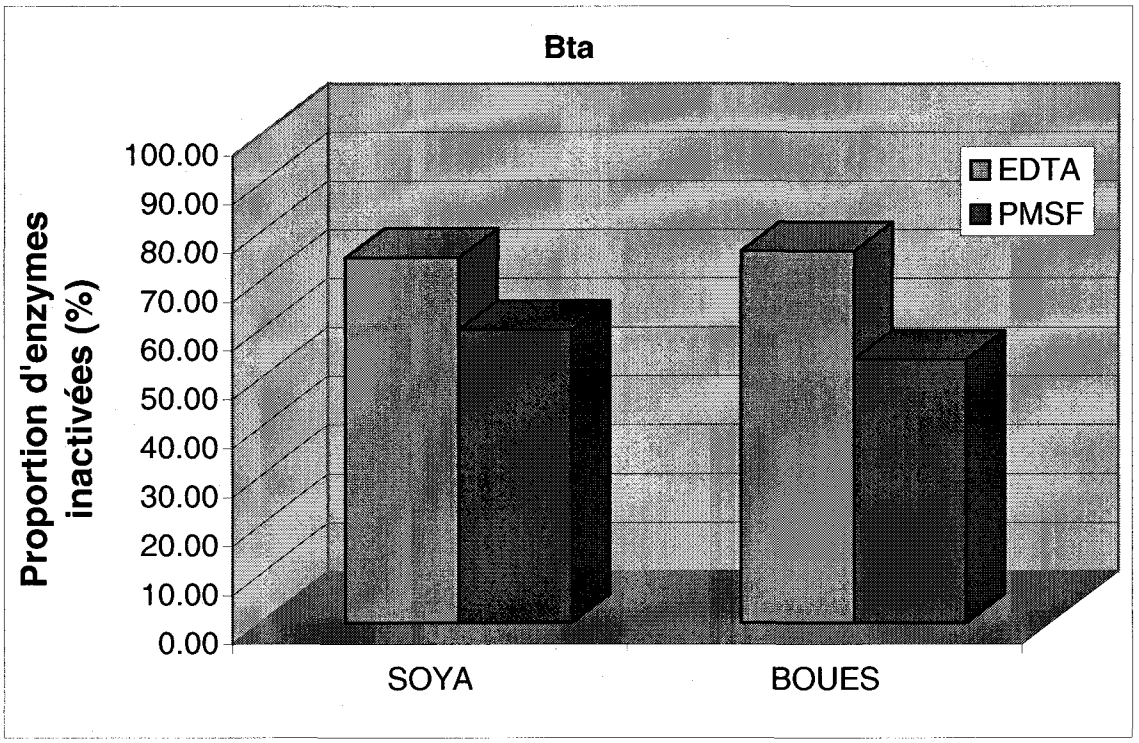


Figure 8d : Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

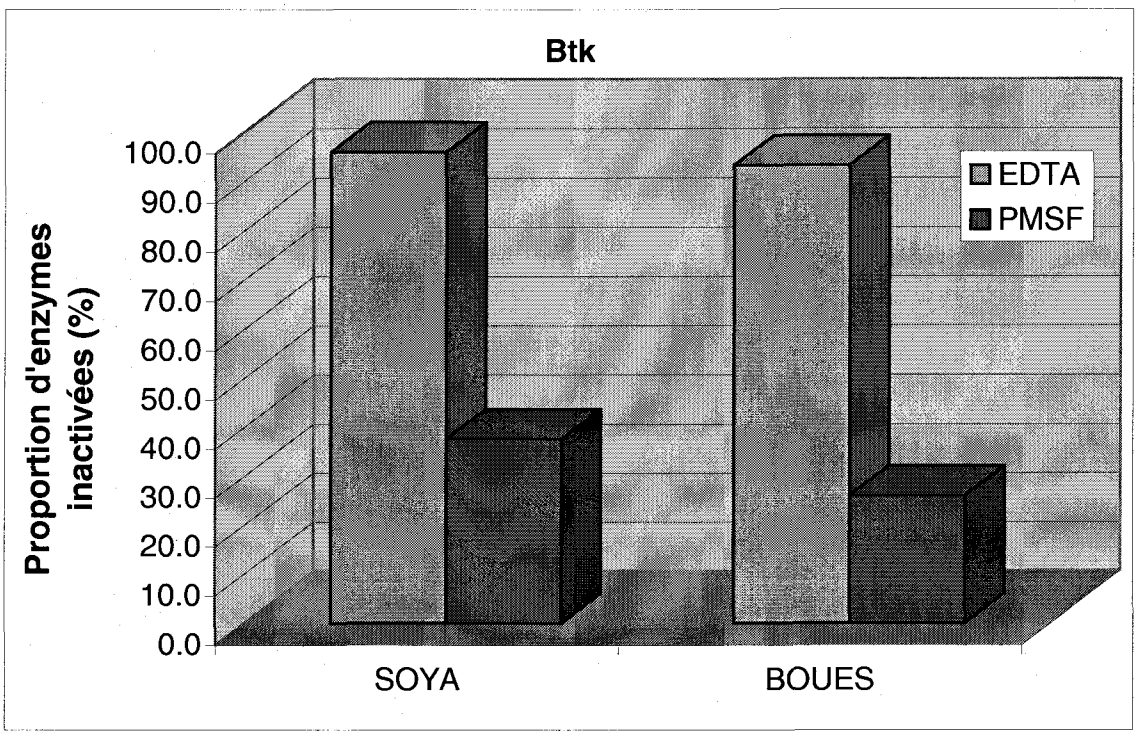


Figure 8 (suite) : Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

L'action des inhibiteurs se fait au niveau du site actif des protéases. Les protéases produites par Bt étant un mélange de protéases alcalines et neutres, les inhibiteurs permettent d'en établir les proportions. L'EDTA (éthylèndiaminetetraacétate) agit spécifiquement sur les protéases neutres en enlevant l'ion métallique présent au site actif. Le PMSM (fluorure de phénylméthylsulphonyl) interagit quant à lui avec le groupement sérine du site actif des protéases alcalines, par phosphorylation ou fluorisation. La forte inhibition obtenue avec l'EDTA permet de déterminer que les protéases neutres sont produites en majorité par les souches utilisées. Par opposition, le PMSF n'inhibe qu'une mince proportion des protéases, prouvant ainsi que la production de protéases alcalines est moins importante que celle des protéases neutres. Ces résultats concordent avec les études portant sur les protéases produites par Bt et qui démontrent que la plupart des protéases produites sont des métalloprotéases, alors qu'une petite fraction représente les protéases alcalines (Andrews *et al.*, 1985; Bibilos et Andrews, 1988; Kumar et Venkateswerlu, 1998a; Reddy *et al.*, 1998; Zouari et Jaoua, 1999). On a remarqué que

l'inhibition était parfois plus élevée en milieu soya qu'en biosolides. Pour expliquer ce phénomène, il faut se rappeler que la nature du milieu influencera les caractéristiques des enzymes synthétisées. La composition des biosolides est très différente de celle du milieu soya et les bactéries peuvent avoir besoin d'enzymes de nature différentes afin d'utiliser les nutriments présents dans le milieu. Les enzymes produites lors de la fermentation en biosolides peuvent être moins sensibles aux inhibiteurs utilisés. On a également observé que, pour certaines souches, le pourcentage combiné des enzymes inactivées par le PMSF et l'EDTA excède souvent 100%. Ceci peut s'expliquer par le fait que certaines protéases alcalines peuvent nécessiter du Ca^{2+} pour leur stabilité, donc un agent chélateur comme l'EDTA peut inactiver l'enzyme (Stefanisti *et al.*, 1995). En altérant légèrement l'enzyme, l'agent inhibiteur peut affecter la conformation de celle-ci et l'empêcher de fonctionner.

4.4 ENTOMOTOXICITÉ

L'entomotoxicité de Bt est obtenue en comparant la mortalité des larves par rapport à celle observée pour le standard et est exprimée en Unités Internationales de toxicité par µL (UI/µL). Les résultats obtenus (Figure 9) permettent de comparer les résultats d'entomotoxicité des différentes souches et selon le milieu de culture utilisé pour la fermentation. On peut également comparer la performance des nouvelles souches, par rapport à celle de la souche de référence, Btk. On remarque ainsi que toutes les nouvelles souches offrent une entomotoxicité plus élevée que Btk. On observe également que les résultats d'entomotoxicité sont nettement supérieurs lorsque les souches de Bt sont cultivées dans les biosolides, plutôt que dans le milieu soya. Par contre, on ne dénote pas une grande variation entre les temps 36 heures et 48 heures lors de la fermentation en biosolides. Ainsi, les souches de Bt4, 8, 12, 14, 21, et a offrent une entomotoxicité intéressante, à environ 15 000 UI/µl .

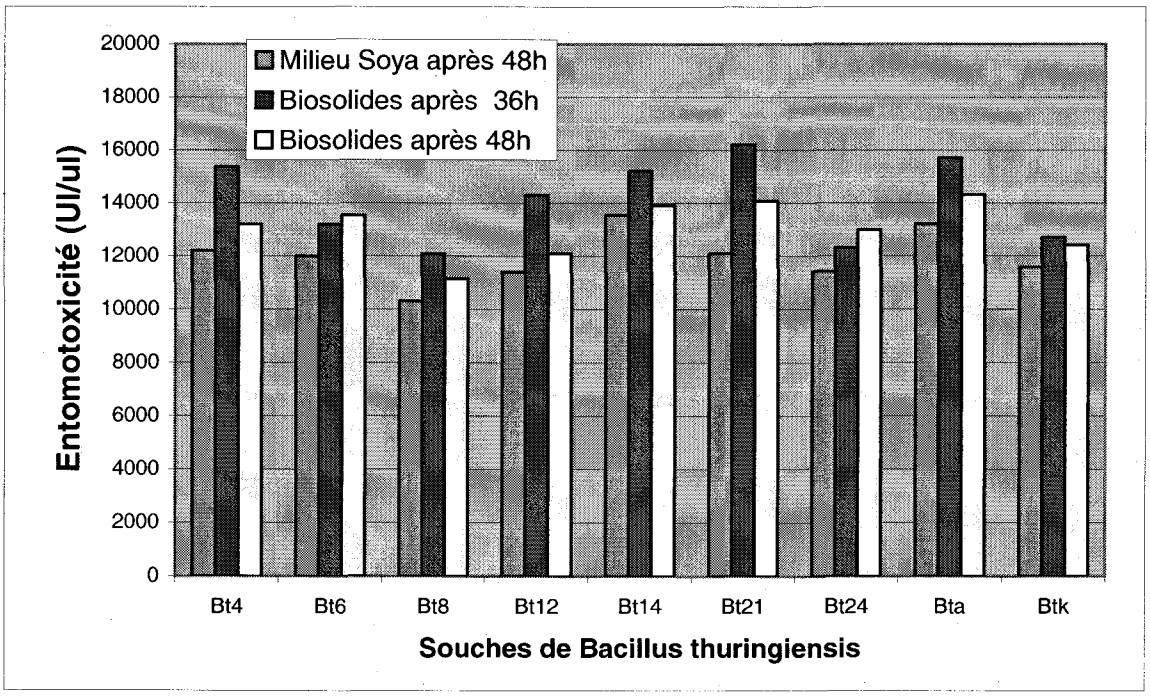


Figure 9 : Entomotoxicité sur des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Les nouvelles souches permettent d'obtenir des résultats très intéressants en ce qui concerne l'entomotoxicité. Elles sont particulièrement performantes dans les biosolides puisqu'elles ont été isolées de ce milieu et y sont mieux acclimatées. Par comparaison, la souche de référence Btk présente des résultats d'entomotoxicité similaires aux autres souches dans le milieu soya, mais présente des résultats inférieurs à presque toutes les autres souches en biosolides. Le peu de variation de la toxicité entre 36 et 48 heures indique que la synthèse des cristaux protéiques a lieu avant 36 heures et qu'elle se maintient par la suite. Ceci représente un avantage considérable en industrie, car la production du biopesticide peut être complétée en 36 heures plutôt qu'en 48 heures. 12 heures de fermentation représentent des coûts énergétiques élevés, ainsi que la main-d'œuvre. Les résultats d'entomotoxicité obtenus pour les souches étudiées dans les travaux de Mohammedi (2001) concordent avec ceux obtenus dans la présente étude.

Tableau 7 : Tableau comparatif de l'entomotoxicité et des activités enzymatiques maximales pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Souche	**Entomotxicité (UI/µl)**			**Activité enzymatique max (UI/ml)**	
	Soya (48 h)	Biosolides (36 h)	Biosolides (48 h)	Soya	Biosolides
Bt4	12200	15373	13202	2.9 (12h)	2.4 (30h)
Bt6	12002	13202	13535	3.5 (9h)	1.7 (15h)
Bt8	10308	12087	11149	3.6 (6h)	2.0 (12h)
Bt12	11392	14317	12099	2.7 (15h)	1.3 (48h)
Bt14	13569	15217	13926	4.2 (15h)	2.1 (36h)
Bt21	12096	16214	14082	4.5 (6h)	3.4 (48h)
Bt24	11424	12322	12987	3.3 (12h)	2.3 (48h)
Bta	13221	15706	14317	3.0 (12h)	1.1 (48h)
Btk	11589	12713	12420	3.0 (48h)	2.5 (48h)

Il est difficile d'établir une relation entre l'entomotoxicité et l'activité enzymatique à partir des résultats obtenus dans cette étude. Le Tableau 7 permet de constater que l'activité enzymatique ne semble pas toujours influencer l'entomotoxicité. Lorsque l'activité enzymatique est faible, l'entomotoxicité l'est parfois aussi et vice-versa. Les

résultats permettent des observations différentes selon qu'on observe les souches entre elles ou chaque souche dans les deux milieux de culture. Pour toutes les souches, l'activité enzymatique est plus faible et l'entomotoxicité plus élevée dans les biosolides, ce qui permet de penser que l'activité enzymatique élevée en milieu soya aurait eu une influence sur le cristal protéique en le dégradant. Ceci correspond aux résultats obtenus par Zouari *et al.* (2002), qui démontrait qu'une activité enzymatique très élevée chez Bt résultait en une entomotoxicité plus faible.

Par contre, si on compare les souches entre elles, pour chaque milieu de culture, on n'observe par de relation distincte entre l'activité enzymatique et l'entomotoxicité. Dans le milieu soya, la souche Bt14 possède l'entomotoxicité la plus élevée (13569 UI/µl) et Bt8 la toxicité la plus faible (10308 UI/µl). Pourtant, ces deux souches possèdent une bonne activité enzymatique de 4.2 et de 3.6 UI/ml respectivement. On observe la même tendance en biosolides. La souche Bta possède l'activité enzymatique la plus faible (1.1 UI/ml) et Bt21 la plus élevée (3.4 UI/ml), mais les deux souches possèdent une entomotoxicité presque identique de 14317 et 14082 UI/µl respectivement. Ceci indiquerait que les protéases produites chez les nouvelles souches de Bt n'hydrolysent pas le cristal protéique ou dans une proportion trop petite pour avoir un impact significatif sur l'entomotoxicité.

4.5 ÉTUDE SUR LE COEFFICIENT DE TRANSFERT VOLUMÉTRIQUE D'OXYGÈNE (K_La)

La mesure du coefficient de transfert volumétrique permet d'exprimer la capacité d'oxygénation du milieu contenu dans le bioréacteur. Le taux de transfert de l'oxygène dépend de plusieurs facteurs : la température, la viscosité du milieu, la vitesse d'agitation, le taux d'aération, la géométrie de l'agitateur et le fermenteur.

La méthode utilisée lors de cette étude est basée sur la méthode dynamique décrite par Aiba et al. (1993). On interrompt momentanément l'aération, pendant un moment suffisamment bref pour que le métabolisme microbien ne soit affecté. On note alors à toutes les 10 secondes la valeur d'oxygène dissous obtenue grâce à la sonde d'oxygène. La diminution observée est causée exclusivement par la demande microbienne en oxygène ($Q_{O2}X$). Cette réduction est habituellement linéaire et le calcul de la pente permet d'obtenir la vitesse de consommation d'oxygène.

Avant que la concentration en oxygène dissous n'ait atteint le seuil critique, l'aération est remise en marche. On observe alors un retour aux concentrations normales et le phénomène présente aussi une forme linéaire. L'inverse du K_La peut être mesuré grâce à la pente du diagramme de l'évolution de la concentration initiale d'oxygène dissous dans le milieu de culture en fonction de de $dC/dt + Q_{O2}X$.

Les résultats obtenus lors de l'étude sur le coefficient de transfert volumétrique sont présentés dans le Tableau 8 à l'aide de la légende suivante :

- OTR (Oxygen transfer rate) : Vitesse de transfert d'oxygène en mmol $l^{-1}.h^{-1}$;
- OUR (Oxygen uptake rate) : Vitesse de consommation d'oxygène en mmol $l^{-1}.h^{-1}$;
- C^* : Concentration saturante en oxygène dans le milieu de culture en mmol/L ;
- C : Concentration initiale en oxygène dans le milieu de culture en mmol/l.

Tableau 8 : Résultats obtenus lors de l'étude du coefficient de transfert volumétrique d'oxygène pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pour les 24 premières heures.

Bt4

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
H		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	67.6	45.00	80.1	0.139	12.5	0.0296	1.33	1.18	298.08	4.97
6	46	90.00	73.3	0.407	27.3	0.0646	5.81	3.46	500.21	6.97
9	67	90.0	86.1	0.161	19.1	0.0450	4.05	1.37	489.12	5.97
12	90.4	90.0	94.2	0.099	3.8	0.0089	0.80	0.84	488.25	5.96
15	93	104.2	94.6	0.078	1.6	0.0038	0.39	0.66	492.62	5.96
18	92	102.9	95.3	0.064	3.3	0.0077	0.79	0.55	487.37	5.96
21	95.2	115.9	97.2	0.064	2.0	0.0047	0.55	0.55	489.71	5.97
24	93.4	102.9	95.5	0.058	2.1	0.0050	0.52	0.50	487.67	4.96

Bt6

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
H		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	68	60.00	75.3	0.153	7.3	0.0173	1.04	1.30	305.37	4.96
6	41.7	90.00	57.7	0.376	16.0	0.0379	3.41	3.20	400.46	6.46
9	72.3	100.6	80.8	0.202	8.5	0.0201	2.02	1.72	446.54	4.97
12	78.5	90.0	82.5	0.091	4.0	0.0093	0.84	0.78	449.75	4.97
15	81.6	120.0	83.3	0.073	1.7	0.0040	0.48	0.62	448.00	4.96
18	83.1	120.0	84.7	0.069	1.6	0.0037	0.45	0.59	444.50	4.96
21	83.5	102.9	85.1	0.049	1.6	0.0039	0.40	0.41	458.21	4.96
24	84.7	102.9	85.6	0.038	0.9	0.0021	0.22	0.32	446.54	4.97

Bt8

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	75.1	84.17	80.3	0.144	5.2	0.0122	1.02	1.22	354.08	2.96
6	45.8	82.41	64.5	0.459	18.7	0.0442	3.64	3.90	353.21	2.96
9	55.6	69.6	67.9	0.221	12.3	0.0291	2.02	1.88	355.54	2.96
12	64.4	82.4	74.2	0.250	9.8	0.0230	1.90	2.13	353.21	2.96
15	73.8	90.0	78.7	0.122	4.9	0.0116	1.04	1.04	351.17	2.95
18	76.4	113.7	79.7	0.101	3.3	0.0077	0.88	0.86	354.08	2.97
21	78.8	120.0	81.6	0.093	2.8	0.0066	0.79	0.79	345.92	2.97
24	84.6	154.3	87	0.095	2.4	0.0057	0.87	0.80	351.75	2.97

Bt12

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	77.4	72.0	80.2	0.056	2.8	0.0067	0.48	0.47	352.04	2.96
6	55.2	68.4	69.9	0.256	14.7	0.0347	2.37	2.18	347.37	2.97
9	60.2	81.8	70.2	0.220	10.0	0.0236	1.93	1.87	345.33	2.96
12	63.9	72.0	72.1	0.172	8.2	0.0194	1.40	1.47	340.67	2.96
15	70.9	92.1	74.9	0.109	3.9	0.0093	0.86	0.93	345.04	2.96
18	72	91.6	76.2	0.110	4.2	0.0099	0.91	0.94	336.87	2.97
21	74.3	128.6	75.9	0.062	1.6	0.0038	0.49	0.53	374.50	2.98
24	76.9	137.5	78.1	0.047	1.2	0.0028	0.39	0.40	339.79	2.97

Bt14

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	65.2	86.09	69.29	0.119	4.1	0.0097	0.83	1.01	301.58	1.96
6	75.2	90.00	83.96	0.198	8.8	0.0207	1.86	1.69	513.33	3.97
9	76.2	99.53	82.19	0.155	6.0	0.0141	1.41	1.31	526.17	4.47
12	77.5	89.36	82.74	0.113	5.2	0.0124	1.11	0.96	526.17	4.47
15	78	114.4	80.06	0.073	2.1	0.0049	0.56	0.62	520.92	4.47
18	79.2	122.1	80.92	0.055	1.7	0.0041	0.50	0.47	520.92	4.47
21	79.4	129.2	81.04	0.051	1.6	0.0039	0.50	0.43	527.33	4.47
24	79.6	149.8	80.87	0.050	1.3	0.0030	0.45	0.42	519.75	4.45

Bt21

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*-$C_{Initial}$	C*-$C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	76.1	77.65	78.93	0.092	2.8	0.0067	0.52	0.78	301.29	0.27
6	71.3	81.82	76.88	0.125	5.6	0.0132	1.08	1.07	356.42	1.98
9	58.1	118.20	70.86	0.439	12.8	0.0301	3.56	3.73	454.71	2.97
12	62.7	121.40	70.06	0.279	7.4	0.0174	2.11	2.38	443.62	2.98
15	70.6	146.04	75.62	0.228	5.0	0.0119	1.73	1.94	452.37	3.47
18	76	157.0	78.22	0.112	2.2	0.0052	0.82	0.95	446.54	3.46
21	74.4	144.0	77.15	0.122	2.8	0.0065	0.94	1.04	455.58	3.46
24	76.9	153.6	78.98	0.080	2.1	0.0049	0.75	0.68	455.00	3.46

Bt24

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*- $C_{Initial}$	C*- $C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	86.4	102.86	87.24	0.024	0.8	0.0020	0.20	0.20	301.29	1.46
6	46.5	144.59	58.53	0.589	12.0	0.0284	4.11	5.01	352.04	1.96
9	46.4	90.55	57.46	0.399	11.1	0.0261	2.37	3.39	399.87	2.97
12	60.4	108.32	64.17	0.21	3.8	0.0089	0.96	1.79	397.83	2.97
15	70.8	128.6	75.08	0.241	4.3	0.0101	1.30	2.05	399.29	2.97
18	80.1	130.1	84.44	0.196	4.3	0.0103	1.33	1.66	401.04	2.97
21	81.5	124.9	85.28	0.167	3.8	0.0089	1.12	1.42	402.21	2.96
24	79.2	144.0	81.44	0.098	2.2	0.0053	0.76	0.83	405.12	2.96

Bta

Age	$C_{Initial}$	K_La	C*	QO_2X	C*- $C_{Initial}$	C*- $C_{Initial}$	OTR	OUR	Agitation	Aération
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h	RPM	LPM
3	82.5	196.36	83.2	0.029	0.7	0.0017	0.32	0.25	305.37	1.47
6	64.7	106.93	74.21	0.303	9.5	0.0225	2.40	2.58	355.25	1.98
9	45.2	102.86	59.69	0.411	14.5	0.0342	3.52	3.50	452.96	2.97
12	66.1	106.16	71.13	0.240	5.0	0.0119	1.26	2.04	453.25	2.97
15	69.8	105.96	72.62	0.171	2.8	0.0067	0.71	1.46	451.50	2.97
18	69.9	107.23	74.9	0.174	5.0	0.0118	1.27	1.48	452.67	2.97
21	71.7	111.2	75.85	0.155	4.1	0.0098	1.09	1.32	450.04	2.97
24	76.2	120.0	79.15	0.095	3.0	0.0070	0.84	0.81	454.71	2.97

Les résultats de K_La pour les nouvelles souches nous permettent de connaître les conditions de culture requises pour chacune d'elles lorsqu'elles sont cultivées dans les biosolides. Plus le K_La est élevé, plus la demande en oxygène est grande. Ceci peut influencer grandement les coûts énergétiques reliés au processus, puisqu'on doit alors augmenter l'aération ou l'agitation afin de maintenir le K_La dans les limites respectables. L'augmentation de l'agitation permet une meilleure dispersion de l'oxygène (Parakulsuksatid, 2000). On remarque ainsi que toutes les souches possèdent des K_La oscillant autour de 100 h^{-1}, mais que les conditions d'aération et d'agitation pour maintenir cette valeur varient d'une souche à l'autre. Pour les souches Bt4, 6 et 14, les valeurs sont élevées pour l'agitation (environ 500 RPM) et l'aération (de 4,5 à 6 LPM), elles demandent donc beaucoup d'oxygène pour leur croissance. Pour les autres souches, les paramètres d'agitation et d'aération sont plus faibles, de 350 à 400 RPM et environ 3 LPM respectivement. Elles sont ainsi plus avantageuses energétiquement. Ceci est

particulièrement vrai pour les souches Bt8 et Bt12 qui présentent des K_La maximums de 154 et 137 h^{-1} respectivement dans des conditions d'agitation d'environ 350 RPM et d'agitation de près de 3 LPM. Ces paramètres sont inférieurs à ceux utilisés pour les autres souches, mais les résultats de K_La sont sensiblement les mêmes. Ces deux souches demandent donc moins d'oxygène que les autres souches et sont ainsi moins énergivore.

L'utilisation de biosolides pour la fermentation affecte le K_La principalement à cause de la viscosité du milieu. En effet, plus la viscosité du milieu augmente, plus la disponibilité de l'air diminue car de grosses bulles se forment (Ozbek et Gayik, 2001). L'utilisation d'une concentration de biosolides de 25 g/l permet d'avoir une viscosité raisonnable.

L'ajout d'agents anti-mousse agit également sur le transfert d'oxygène. Les agents surfactants utilisés font diminuer la tension de surface, créant ainsi des bulles d'air plus grosses qui ne peuvent se déplacer aussi aisément dans le milieu de culture (Parakulsuksatid, 2000).

Afin de comparer le taux de transfert volumétrique d'oxygène en fonction du milieu de culture, le K_La a été mesuré pour les souches Bt8 et Bt12 dans le milieu soya à 3, 6 et 12 heures, ce qui représente des moments importants pour le transfert d'oxygène. Les conditions de culture (agitation, aération, pH, température) sont les mêmes qu'avec les biosolides. Les résultats de cette comparaison se trouvent au Tableau 9.

Tableau 9 : Résultats obtenus lors de l'étude du coefficient de transfert volumétrique d'oxygène pour les souches Bt8 et Bt12 cultivées en biosolides et en milieu soya dans un fermenteur de 15 litres à 3, 6 et 12 heures.

Bt8 Biosolides

Age	$C_{Initial}$	K_La	C^*	QO_2X	$C^*-C_{Initial}$	$C^*-C_{Initial}$	OTR	OUR
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h
3	75.1	84.17	80.25	0.144	5.2	0.0122	1.02	1.22
6	45.8	82.41	64.5	0.459	18.7	0.0442	3.64	3.90
12	64.4	82.4	74.15	0.250	9.8	0.0230	1.90	2.13

Bt8 Soya

Age	$C_{Initial}$	K_La	C^*	QO_2X	$C^*-C_{Initial}$	$C^*-C_{Initial}$	OTR	OUR
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h
3	68.3	136.80	69.1	0.353	0.8	0.0019	0.26	3.00
6	31.3	91.64	33	0.385	1.7	0.0040	0.37	3.27
12	78	126.0	79.1	0.163	1.1	0.0026	0.33	1.38

Bt12 Biosolides

Age	$C_{Initial}$	K_La	C^*	QO_2X	$C^*-C_{Initial}$	$C^*-C_{Initial}$	OTR	OUR
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h
3	77.4	72.00	80.22	0.056	2.8	0.0067	0.48	0.47
6	55.2	68.39	69.88	0.256	14.7	0.0347	2.37	2.18
12	63.9	72.0	72.11	0.172	8.2	0.0194	1.40	1.47

Bt12 Soya

Age	$C_{Initial}$	K_La	C^*	QO_2X	$C^*-C_{Initial}$	$C^*-C_{Initial}$	OTR	OUR
h		h-1	%	%/sec	%	mmol/l	mmol/l/h	mmol/l/h
3	56	102.68	58.1	0.907	2.1	0.0050	0.51	7.71
6	42	97.40	45.2	0.311	3.2	0.0076	0.74	2.64
12	78.9	117.6	80	0.186	1.1	0.0026	0.31	1.58

On remarque immédiatement que la demande d'oxygène en beaucoup plus élevée dans le milieu soya que dans les biosolides. La vitesse de consommation de l'oxygène (OUR) est grandement supérieure à la vitesse de transfert d'oxygène (OTR) en milieu soya. Les micro-organismes requièrent une quantité d'oxygène que le milieu de culture ne peut leur procurer. Ceci est particulièrement vrai en début d'expérience. Par exemple, à 3 heures, la souche Bt12 en milieu soya requiert 7.71 mmol/l/h d'oxygène alors que le milieu n'en fournit que 0.51 mmol/l/h. Il faut toutefois se rappeler que les souches de Bt consomment rapidement les nutriments du milieu soya lors de la phase exponentielle. Les nutriments étant disponibles, les micro-organismes se multiplient rapidement et la demande d'oxygène augmente également. Le coefficient de transfert volumétrique d'oxygène

volumétrique est ainsi plus élevé en milieu soya qu'en biosolides et ce, même si les conditions de culture sont les mêmes. Ceci nous indique que l'utilisation des biosolides est plus avantageuse énergétiquement, puisque pour une agitation et une aération donnée, la demande d'oxygène est moins élevée. Ceci peut être dû au fait que les micro-organismes utilisent les nutriments présents dans les biosolides sur une période plus étendue, mais à un rythme plus constant qu'en milieu soya.

Les résultats de K_La permettent également de mettre en perspective les résultats des comptes viables de cellules et de spores, d'activité enzymatique et d'entomotoxicité. Le Tableau 10 regroupe les principaux résultats obtenus pour les nouvelles souches de Bt cultivées dans les biosolides. On remarque que pour la souche Bt21, on obtient des valeurs élevées pour tous les paramètres. Pour les souches présentant une entomotoxicité et des comptes de cellules et de spores plus faibles possèdent les valeurs de K_La les moins élevées. Ceci concorde avec les travaux d'Avignone-Rossa et al. (1992), qui ont démontré que les résultats de comptes de spores et d'entomotoxicité étaient maximums lorsque l'oxygénation était optimale.

Tableau 10 : Résultats maximums pour les principaux paramètres étudiés chez les nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées dans les biosolides.

Bt	CV	CS	Entomo	Act. Enz	K_La max	Agitation	Aération	OTR	OUR	µ max
	cv/ml	cs/ml	UI/µl	UI/ml	h-1	RPM	LPM	mmole/l/h		
4	4.5E+09	4.2E+09	15373	2.40	115.9	489.7	6.0	0.55	0.55	0.506
6	4.6E+09	4.2E+09	13535	1.65	120.0	444.5	5.0	0.45	0.59	0.412
8	5.7E+09	2.1E+09	12087	2.00	154.3	351.7	3.0	0.87	0.80	0.469
12	4.7E+09	3.5E+09	12099	1.25	137.5	339.8	3.0	0.39	0.40	0.504
14	4.7E+09	2.1E+08	15217	2.13	149.8	519.7	4.5	0.45	0.42	0.553
21	5.7E+09	5.5E+09	16214	3.37	157.0	446.5	3.5	0.82	0.95	0.544
24	2.6E+09	1.8E+09	12987	2.29	144.0	405.1	3.0	0.76	0.83	0.456
a	3.4E+09	1.5E+09	15706	1.10	120.0	454.7	3.0	0.84	0.81	0.452

4.6 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS POUR LES NOUVELLES SOUCHES DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

4.6.1 Bt var. *kurstaki*

Les résultats obtenus pour cette souche servent de base de comparaison pour toutes les autres nouvelles souches de Bt étudiées. En effet, la souche Btk est celle utilisée en industrie et dans la plupart des recherches portant sur Bt. Les résultats sont caractéristiques de la plupart des souches de Bt. On obtient des courbes similaires pour le dénombrement des cellules et des spores et pour l'activité enzymatique, avec des résultats plus élevés en milieu soya. Lors de l'étude de variation du pH et de la température, le maximum atteint est d'environ 4 UI/ml dans les biosolides et de 2,5 UI/ml dans le milieu soya, mais on observe des pics d'activité enzymatique à pH 7, 9 et 11 pour les deux milieux. On remarque aussi que les protéases de Btk sont très thermostables dans les biosolides (80% de l'activité enzymatique maintenue après 150 minutes), mais elles le sont beaucoup moins dans le milieu soya (30% de l'activité enzymatique maintenue après 150 minutes). Les ions Ca^{2+} viennent grandement stabiliser les protéases et pour le milieu soya, 80% de l'activité enzymatique est maintenue après 150 minutes avec ajout de $CaCl_2$, révélant ainsi une grande proportion de métalloprotéases. Par contre, l'addition de $CaCl_2$, après une exposition prolongée à la chaleur des protéases, n'est pas suffisante pour les réactiver. En ce qui concerne l'effet des inhibiteurs, on observe une proportion beaucoup plus importante de protéases neutres (90% de l'activité enzymatique inhibée) que de protéases alcalines (25% de l'activité enzymatique inhibée) et ce, peu importe le milieu de culture utilisé. L'entomotoxicité mesurée est de 12 000 UI/µl dans le milieu soya et d'environ 14 000 UI/µl dans les biosolides.

4.6.2 Les nouvelles souches de Bt

Les résultats obtenus avec les nouvelles souches de Bt donnent d'excellents résultats. De manière générale, on observe des dénombrements de cellules et de spores correspondants à la souche de référence. Les résultats de décompte sont habituellement plus élevés en biosolides qu'en milieu soya, étant donné que les nouvelles souches ont été isolées des

boues d'épuration et y sont ainsi déjà adaptées. Les résultats d'activité enzymatique sont plus élevés en milieu soya qu'en biosolides, ce qui peut être attribuable aux caractéristiques des milieux. Par contre, lorsqu'on fait varier le pH et la température, les résultats sont plus intéressants en biosolides qu'en milieu soya. Ceci peut indiquer la production de protéases s'adaptant plus facilement à des variations de ces paramètres. Ceci est également vrai en ce qui concerne la résistance à une exposition prolongée à la température. En effet, les protéases sont beaucoup plus thermostables lorsque la fermentation s'est faite en biosolides, avec ou sans l'ajout de $CaCl_2$. L'étude avec les inhibiteurs révèle une proportion beaucoup plus élevée de protéases neutres, qui ne présentent pas d'intérêt commercial. Par contre, toutes les souches produisent des protéases alcalines, puisqu'on observe une inhibition par le PMSF de l'activité enzymatique allant de 30 à 65% chez l'ensemble des souches. En ce qui concerne l'entomotoxicité, les nouvelles souches donnent de très bons résultats. On observe une entomotoxicité allant de 10308 à 13569 UI/µl dans le milieu soya et de 11149 à 16214 UI/µl dans les biosolides.

Certaines souches présentent des caractéristiques plus intéressantes que les autres. Bt21 en particulier, se distingue des autres, puisqu'elle donne de bons résultats pour tous les paramètres étudiés. Elle présente une entomotoxicité élevée de 16 214 UI/µl dans les biosolides après 36 heures de fermentation. Elle maintient une activité enzymatique très élevée pour les tests de pH et de température et demeure très thermostable. De plus, elle présente une proportion très élevée de protéases alcalines, puisqu'en présence de PMSF, on observe une inhibition de 60% de l'activité enzymatique.

D'autres souches sont également intéressantes, entre autres Bt4 et Bt14 donnent de bons résultats en ce qui concerne l'entomotoxicité et l'activité enzymatique. Bt6 et Bt12 présentent une entomotoxicité très intéressante, mais ont de faibles activités enzymatiques. En ce qui concerne Bta, l'entomotoxicité est élevée dans les deux milieux, mais l'activité enzymatique est très faible lorsque la fermentation s'est faite dans les biosolides. En ce qui concerne les souches Bt8 et 24, on obtient des valeurs de toxicité et d'activité enzymatique plutôt moyennes.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Les expériences menées lors de ce projet démontrent bien la possibilité de faire croître Bt dans les biosolides afin qu'il y ait production simultanée d'entomotoxines et d'enzymes protéolytiques. Les résultats obtenus sont comparables, sinon plus élevés, à ceux observés en milieu soya. Les biosolides contiennent l'ensemble des éléments nutritifs requis pour la croissance de Bt. L'utilisation de bioréacteurs permet de bien contrôler les paramètres pouvant devenir critiques lors des expériences menées, tels que la température, le pH, l'aération et l'agitation.

Ces travaux ont permis de démontrer que la performance des nouvelles souches de Bt était comparable et parfois plus élevée que celle de la souche de référence, Btk. On observe généralement de 10^9 à 10^{10} cellules par ml et 10^9 spores par ml, ce qui correspond aux résultats obtenus par Mohammedi (2003). Les résultats de décompte sont habituellement plus élevés en biosolides qu'en milieu soya, étant donné que les nouvelles souches ont été isolées des boues d'épuration et y sont ainsi déjà adaptées. Les résultats d'activité enzymatique sont intéressants en milieu soya et dans les biosolides et le pic d'activité enzymatique varie entre 3 et 4,5 UI/ml, ce qui est plus élevé que les résultats de Mohammedi (2003) que ne dépassaient pas 2 UI/ml. Par contre, les protéases produites lorsque la fermentation a lieu dans les biosolides semblent d'adapter plus facilement aux changements de conditions. En effet, ces protéases sont plus actives à des pH et températures différents et restent plus thermostables suite à l'exposition prolongée à la chaleur. Elles sont également moins sensibles aux inhibiteurs de protéases.

Les résultats d'entomotoxicité obtenus avec les nouvelles souches rendent celle-ci très intéressantes, puisqu'elles peuvent présenter une activité avoisinant les 16 000 UI/µl en biosolides. La souche Bt21 a donné les meilleurs résultats, avec une entomotoxicité de 16214 UI/µl après 36 heures de fermentation. Les souches Bt4, Bt14 et Bta donnent également des entomotoxicité intéressantes après 36 heures de fermentation avec, respectivement, 15373, 15217 et 15706 UI/µl. La toxicité des nouvelles souches est plus importante que celle obtenue avec Btk, qui était d'environ de 12 000 UI/µl. De plus, l'entomotoxicité de ces souches est plus élevée dans les biosolides, puisqu'elles y sont

mieux adaptées. Cette caractéristique des nouvelles souches pourrait être explorée plus à fond dans des études à venir. La croissance de Bt et la production d'entomotoxines pourraient être optimisée grâce à des prétraitements ou à l'ajout de certains nutriments, tels que l'apport exogène de source de carbone facilement assimilable.

En ce qui concerne la production d'enzymes protéolytiques, l'emploi d'un bioréacteur est de mise. Le contrôle des paramètres permet d'optimiser la croissance des bactéries, surtout en ce qui concerne le maintien du pH, puisqu'il s'agit d'une des principales difficultés rencontrées lors d'expériences avec des micro-organismes producteurs de protéases. En biosolides, l'activité enzymatique la plus élevée a été obtenue chez Bt21, avec 3.4 UI/ml après 48 heures de fermentation. Cette souche donnait également les meilleurs résultats en milieu soya, avec 4.5 UI/ml après 6 heures de fermentation. Des techniques de biologie moléculaire pourraient également être employées lors de l'étude sur les enzymes protéolytiques, en particulier pour identifier la nature des protéases synthétisées.

Certaines des nouvelles souches méritent d'être l'objet d'études plus poussées. Les souches Bt4, 14 et 21 possèdent des caractéristiques les rendant attrayantes pour une application industrielle. En effet, elles présentent une bonne croissance dans le milieu synthétique et les biosolides et donnent d'excellents résultats d'entomotoxicité et d'activité enzymatique. Il y aurait possibilité d'accroître leur rendement en optimisant les conditions de culture. Les autres souches étudiées donnent également de bons résultats, mais présentent des faiblesses au niveau de l'entomotoxicité ou de l'activité enzymatique. Certaines d'entres elles présentent des résultats moins intéressants lorsque la fermentation se fait dans un de milieu plutôt que dans un autre. Des études plus exhaustives sont de mise afin d'identifier les causes de ces différences. Encore une fois, il est possible qu'une optimisation des conditions de culture permette de rendre ces souches plus performantes.

Cette étude démontre bien la possibilité d'avoir une production simultanée de protéases et d'entomotoxines chez Bt à partir de biosolides. L'intérêt économique associé à cette pratique est des plus pertinent et reste à évaluer. Les efforts ultérieurs de recherche devraient porter sur l'optimisation des conditions de production afin de hausser et de

stabiliser les rendements de production. La relation entre l'activité enzymatique et l'entomotoxicité serait de mise, afin d'établir l'effet des protéases sur le cristal protéique. Une étude plus poussée de chacune des souches, dans le but d'en établir clairement les caractéristiques pourrait être utile lors du procédé d'optimisation.

BIBLIOGRAPHIE

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

2. Abrosimova, L.I., P.V. Babaeva, G.M. Zubareva et V.V. Shevtsov (1986). Influence of mineral salts on the level of exotoxin production and productivity of a culture of *Bacillus thuringiensis*. *Mikrobiologiya*, 55 (3), 440-444.

3. Aiba S., A.E.Humphrey et N.F. Millis (1973). Biochemical Engineering, Second Edition, Academic Press, New York.

4. Andrews, R.E., Jr, M.M. Bibilos et L.A. Bulla, JR. (1985). Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 50, No. 4 : 737-742.

5. Andrews, R.E., Jr, R.M. Faust, H. Wabiko, K.C. Raymond et L.A. Bulla (1987). The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Review in Biotechnology*, 6 : 163-232.

6. APHA-AWWA-WPCF (1989). Standard methods for examination of water and wastewater (Ed. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Trussell, R.R. and Franson, M.A.), 17th edition, APHA, Washington, DC 20005.

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

8. Atlas, R.M. et R. Bartha (1998). Microbial ecology : fundamentals & applications, 4th ed. Benjamin/Cummings Science Publishing, Californie, 693 pages.

9. Avignone-Rossa, C., J. Arcas et C. Mignone (1992). *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation et δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. W.J. *Microbiological Biotechnology*, 8 : 301-304.

10. Avignone-Rossa, C. et C. Mignone (1993). δ-endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 15 (3) : 295-300.

11. Avignone-Rossa, C. Et C. Mignone (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. *Molecular biotechnology*, 4 : 55-71.

12. Barnabé, S. (2000). Utilisation des boues d'épuration comme substrat pour la production de biopesticides : induction abiotique de la sporulation chez *Bacillus thuringiensis*. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Eau, 151 pages.

13. Beegle, C.C. (1990) Bioassay methods for quantification of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin. Dans Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. USA American Chemical Society, 50 eds L.A. Hickle et W.L. Fitch, pages 14-21.

14. Ben Rebah, F., R.D. Tyagi et D. Prevost (2001). Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (6) :467-74.

15. Ben Rebah, F., R.D. Tyagi et D. Prevost (2002). Production of S. meliloti using wastewater sludge as a raw material: effect of nutrient addition and pH control. *Environmental Technology*, 23(6) : 623-629.

16. Ben Rebah, F., Y. Filali-Meknassi, A Yezza, R.D. Tyagi et R.Y. Surampalli (2003). Water and Waste water: Perspectives of Developing Countries, Proceeding of the international Conference, WAPDEC, December 11-13, 2002, New Delhi, India.

17. Bernhard, K. et R. Utz (1993). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. *Bacillus thuringiensis* : An environmental biopesticide : theory and practice (eds P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey et S. Higgs), Wiley, Chichester, pages 255-267.

18. Bibilos, M. et R.E. Andrews, JR (1988). Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translation. *Canadian Journal of Microbiology*, 34 : 740-747.

19. 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 Critical Review in Microbiology*, 8: 147-204.

20. Carroll, J., J. Li et D.J. Ellar (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ-endotoxin poduced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemistry Journal*, 261 : 99-105.

21. Chestukhina, G.G., I.A. Zalunin, L.I. Kostina, T.S. Kotova, S.P. Kattrukha et V.M. Stepanov (1980). Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry Journal*, 187: 457-465.

22. Cooper, D (1994). *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 49 : 21-26.

23. Copping, L.G. et J.J. Menn (2000). Biopesticides : a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science, 56 : 651-676.

24. Demain, A.L (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Research review paper. Biotechnology Advances*, 18 : 499-514.

25. Doi, R.H (1972). Role of proteases in sporulation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 6 : 1-20.

26. Donovan, W.P., Y. Tan et A.C. Slaney (1997). Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of *in vivo* deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 : 2311-2317.

27. Dulmage, H.T. et R.A. Rhodes (1971). Production of pathogens in artificial media. Microbial control of insects and mites (eds H.D. Burges et N.W. Hussey). Academic Press London, pages 507-540.

28. Dulmage, H.T., J.A. Correa et G. Gallegos-Morales (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* through standardization and fermentation development. Bacterial control of mosquitoes and blackflies : biochemistry genetics and applications of *Bacillus thuringiensis isralensis* and *Bacillus sphaericus* (eds H. de Barjac et D. Sutherland), Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, pages 110-133.

29. Ferrero, M.A., G.R. Castro, C.M. Abate, M.D. Baigori et F. Sineriz (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45 : 327-332.

30. Gonzalez, J.M. Jr, H.T. Dulmage et B.C. Carlton (1981). Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmids*, 5 : 351.

31. Gupta, R., K. Gupta, R.K. Saxena et S. Khan (1999). Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 21 : 135-138.

32. Gupta, R., Q.K. Beg et P. Lorenz (2002a). Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 : 15-32.

33. Gupta, R., Q.K. Beg, S. Khan et B. Chauhan (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and proerties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 : 381-395.

34. Hall, F.K. et J.J. Menn (1998). Biopesticides : use and delivery. Humana Press, New Jersey, États-Unis, 626 pages.

35. Hameed, A., T. Keshavarz et C.S. Evans (1999). Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74 : 5-8.

36. Höfte, H et Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Review*, 53 (2) : 242-255.

37. Holt, J.G. et N.R. Krieg (éds) (1984-1989). Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume II, Section 13. Baltimore, Md : Williams & Wilkins.

38. Kerovuo, J., I. Lappalainen et T. Reinikainen (2000). The metal dependance of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268 : 365-369.

39. Kumar, N.S. et G. Venkateswerlu (1998a) Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and their role in protoxin activation. *FEMS Microbiology Letters*, 166 : 377-382.

40. Kumar, N.S. et G. Venkateswerlu (1998b). Endogenous protease-activated 66-kDa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS Microbiology Letters*, 166 : 377-382.

41. Kumar, C.G. et H. Takagi (1999). Microbial alkaline proteases : From a bioindustrial viewpoint. Research review paper. *Biotechnology Advances*, 17 : 561-597.

42. Kumar, C.G. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline proteases from alkalophic *Bacillus pumilus. Letters in Applied Microbiology*, 34 : 13-17.

43. Kunitz, M. (1946). Crystalline soybean trypsin inhibitor. Pages 291-310.

44. Lachhab, K., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material : effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37 : 197-208.

45. Lee, J-K., Y-O. Kim, H-K. Kim, Y-S. Park et T-K. Oh (1996). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60 : 840-846.

46. Li, E. et A.A. Yousten (1975). Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis. Applied Microbiology*, 30 : 354-361.

47. Lisansky, S.G. (1996). Biopesticides : markets, technology, registration & IPR companies 4th edition. CPL Scientific, Newbury, Royaume-Uni, 2 volumes, 549 pages.

48. Meenakshisundaresh, K.S. et G.T. Gujar (1998). Proteolysis of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* endotoxin with midgut proteases of some important lepidopterous species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36 : 593-598.

49. MEF (1998). Plan d'action québecois sur la gestion des matières résiduelles 1998-2008. Ministère de l'Environnement et de la Faune, Québec, 56 pages.

50. Meunier, N. (1999). Évaluation du potential de production de proteases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Eau, 168 pages.

51. Mohammedi, S. (2003). Isolement et caractérisation des souches de *Bacillus thuringiensis* dans les boues d'épuration. Thèse de doctorat, Université du Québec, INRS-Eau, 171 pages. Thèse à venir.

52. Oppert, B., K.J. Kramer, R.W. Beeman, D. Johnson et W.H. McGaughey (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 38 : 23473-23476.

53. Oppert, B. (1999). Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42 : 1-12.

54. Özbek, B. et S. Gayik (2001). The Studies on the Oxygen Mass Transfer Coefficient in a Bioreactor. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 729-741.

55. Parakulsuksatid, P. (2000). Utilization of a Microbubble Dispersion to Increase Oxygen Transfer in Pilot-Scale Baker' s Yeast Fermentation Unit. Mémoire de maîtrise, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. 108 pages.

56. Raham, R.N.Z.A., C.N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W.M.Z.W. Yunus et A.B. Salleh (1994). Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 : 822-827.

57. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge et V.V. Deshpande (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biological Reviews*, Vol.62, No.3 : 597-635.

58. Reddy, S.T., N.S. Kumar et G. Venkateswerlu (1998). Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains. *Biotechnology Letters*, Vol.20, No.3 : 279-281.

59. Rowe, G.E. et A. Margaritis (1987). Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *CRC Critical Review in Biotechnology*, 6 (1): 87.

60. Sachdeva, V., R.D. Tyagi et J.R. Valero (1999). Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Research Developments in Microbiology*, 3 : 363-375.

61. Sachdeva, V., R.D. Tyagi et J.R. Valero (2000). Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal. *Water Science and Technology*, 42 : 211-216.

62. Scherrer, P., P. Lüthy et B. Trumpi (1973). Production of δ-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Applied Microbiology*, 25(4): 644-646.

63. Secades, P. et J.A. Guijarro (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.65, No.9 : 3969-3975.

64. Stefanisti, D., G. Sakellaris et J-R. Garel (1995). The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiology Letters*, 128 : 53-58.

65. Takami, H., T. Akiba et K. Horikoshi (1989). Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* ap. No. AH-101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30 : 120-124.

66. Tirado Montiel, M.L., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (1998). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using waste materials. In Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products 2nd ed., Ed. A.M. Martin, pp. 480-516. International Thomson Publishing, Great Britain.

67. Tirado Montiel, M.L., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Ressources*, Vol.35, No.16 : 3807-3816.

68. Tyagi, R.D., V. Sikati Foko, S. Barnabé, A.S. Vidyarthi et J.R. Valéro (2001). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, 46 (10) : 247-254.

69. Valéro, J.R., S.N. Bourque, D.S. Langlois et A. Copeman (1993). Contrôle microbiologique des insectes forestiers nuisibles : un survol. *INVIVO*, Vol.13, No.3 : 8-10.

70. Vidyarthi, A.S., R.D. Tyagi et J.R. Valéro (2001). Effect of surface active agents on the production of biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Science and Technology*, 44(10) : 253-259.

71. Vidyarthi, A.S., R.D. Tyagi, J.R. Valéro et R.Y. Surampalli (2002). Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research*, 36 (19) : 4850-4860.

72. Whiteley, H.R. et H.E. Schnepf (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40 : 549-576.

73. Yang, X. et S.S. Wang (1998). Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective, Minireview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28 : 95-98.

74. Zouari, N. et S. Jaoua (1999). The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23 : 497-502.

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

76. Zouari, N., O. Achour et S. Jaoua (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fis meal media in 2- and 20-dm^3 fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77 : 877-882.

ANNEXE A

Recettes des solutions tampons utilisées pour les expériences de caractérisation (les quantités sont diluées dans un litre d'eau)

pH 6 (Tampon phosphate Sorensen)

- 7.60g KH_2PO_4;
- 1.46g Na_2HPO_4.

pH 7 (Tampon borax-phosphate Kolthoff)

- 7,45g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$;
- 8,30g KH_2PO_4.

pH 8 (Tampon borate)

- 13.60g H_3BO_3;
- 2.90g NaCl;
- 19,10g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$.

pH 9 (Tampon borate Clark & Lub)

- 3.10g H_3BO_3;
- 3.73g KCl;
- 0.85g NaOH.

pH 10 (Tampon carbonate-bicarbonate Delort & King)

- 2.93g Na_2CO_3;
- 1.90g $NaHCO_3$.

pH 11 (Tampon Robinson et Stokes)

- 3.55g Na_2HPO_4;
- 0.16g NaOH.

pH 12 (Tampon Robinson et Stokes)

- 3.55g Na_2HPO_4;
- 1.08g NaOH.

ANNEXE B

Décompte des cellules et des spores par millilitre pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures

Bt4	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	1.20E+07	5.80E+06	1.30E+04	
3	1.10E+08	5.83E+07	4.30E+04	6.60E+04
6	9.00E+08	1.21E+08	3.00E+05	7.60E+04
9	5.80E+08	1.30E+08	3.30E+05	1.80E+06
12	1.20E+09	4.50E+08	3.00E+06	3.00E+06
15	2.10E+09	7.30E+08	3.00E+07	3.00E+07
18	1.77E+09	1.10E+09	3.00E+08	3.00E+08
21	1.27E+09	1.20E+09	5.00E+08	8.80E+08
24	5.70E+08	1.50E+09	6.50E+08	9.60E+08
27	1.00E+10	2.40E+09	3.00E+09	1.04E+09
30	5.20E+09	3.40E+09	1.30E+09	2.00E+09
33	4.00E+09	3.70E+09	6.50E+08	2.90E+09
36	5.10E+09	3.90E+09	7.10E+08	3.60E+09
48	3.30E+09	4.50E+09	8.10E+08	4.20E+09

Bt6	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	1.10E+08	5.90E+06	1.00E+04	
3	6.20E+08	4.90E+07	3.50E+04	4.75E+04
6	1.40E+09	7.00E+07	3.90E+05	8.50E+04
9	1.10E+09	1.00E+08	2.90E+05	1.00E+05
12	9.20E+08	3.00E+08	8.00E+05	3.00E+06
15	8.70E+08	7.50E+08	3.00E+06	3.00E+07
18	6.90E+08	8.53E+08	4.00E+07	3.00E+08
21	1.50E+09	1.07E+09	5.00E+08	8.90E+08
24	1.80E+09	1.93E+09	1.04E+09	9.20E+08
27	2.00E+09	2.40E+09	1.13E+09	1.03E+09
30	3.10E+09	3.07E+09	1.40E+09	2.20E+09
33	2.20E+09	3.53E+09	8.00E+08	2.73E+09
36	2.35E+09	4.03E+09	1.10E+09	3.53E+09
48	2.37E+09	4.57E+09	1.20E+09	4.20E+09

Bt8	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	1.50E+07	6.93E+06	1.50E+04	
3	7.50E+07	7.60E+07	8.50E+04	4.00E+04
6	1.50E+08	5.65E+08	1.00E+05	4.60E+05
9	6.60E+08	3.85E+08	3.00E+06	2.08E+06
12	4.20E+08	7.90E+08	3.00E+08	5.00E+06
15	3.70E+08	2.37E+09	3.20E+08	1.00E+07
18	5.40E+08	3.43E+09	3.70E+08	6.00E+07
21	6.40E+08	4.67E+09	4.20E+08	1.12E+09
24	9.00E+08	3.00E+09	5.40E+08	8.90E+08
27	9.50E+08	1.23E+09	6.20E+08	7.27E+08
30	1.10E+09	2.40E+09	6.50E+08	1.07E+09
33	8.50E+08	1.53E+09	6.65E+08	1.53E+09
36	7.00E+08	3.20E+09	6.80E+08	2.10E+09
48	9.20E+08	5.70E+09	7.40E+08	1.33E+09

Bt12	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	9.80E+06	8.60E+06	1.40E+04	
3	5.10E+07	1.83E+07	4.20E+04	4.00E+04
6	1.90E+08	3.47E+08	6.20E+04	4.50E+05
9	4.20E+08	5.00E+08	1.10E+06	2.50E+06
12	4.70E+08	6.00E+08	1.90E+07	5.00E+06
15	6.60E+08	7.00E+08	3.00E+08	1.50E+07
18	4.40E+08	7.70E+08	4.00E+07	7.00E+07
21	4.90E+08	9.67E+08	4.50E+08	7.20E+08
24	9.40E+08	3.00E+09	5.40E+08	4.50E+08
27	8.50E+08	3.40E+09	6.20E+08	4.17E+08
30	1.40E+09	3.80E+09	6.90E+08	3.50E+09
33	9.00E+08	4.40E+09	7.05E+08	1.90E+09
36	7.40E+08	5.00E+09	7.20E+08	1.70E+09
48	1.02E+09	5.70E+09	8.00E+08	1.30E+09

Bt14	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	4.53E+06	5.70E+06		
3	9.00E+06	7.73E+06	3.00E+05	1.47E+04
6	1.83E+08	1.10E+08	3.50E+05	3.03E+05
9	2.87E+08	5.90E+08	3.00E+06	5.73E+05
12	1.17E+08	6.20E+08	3.50E+06	7.00E+05
15	6.27E+08	8.00E+08	3.00E+07	3.00E+06
18	4.73E+08	9.37E+08	3.00E+08	1.78E+07
21	4.10E+08	9.87E+08	3.87E+08	7.07E+07
24	7.00E+08	1.00E+09	5.90E+08	9.53E+07
27	1.00E+09	1.97E+09	6.70E+08	1.01E+08
30	1.60E+09	2.27E+09	1.20E+09	1.37E+08
33	2.00E+09	4.00E+09	1.97E+09	1.63E+08
36	3.50E+09	4.40E+09	1.47E+09	1.77E+08
48	4.60E+09	4.70E+09	2.23E+09	2.10E+08

Bt21	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	2.40E+06	2.73E+06	1.80E+05	
3	7.00E+06	4.00E+06	4.00E+05	3.00E+05
6	3.00E+07	9.00E+06	3.20E+04	3.50E+05
9	1.60E+08	5.00E+07	4.00E+05	3.00E+06
12	3.00E+08	1.60E+08	4.00E+06	3.50E+06
15	3.40E+08	7.70E+08	5.00E+07	3.00E+07
18	2.30E+08	9.37E+08	9.00E+07	3.00E+08
21	5.20E+08	7.00E+08	1.20E+08	4.83E+08
24	1.90E+09	8.27E+08	3.50E+08	8.53E+08
27	2.90E+09	1.20E+09	1.30E+09	7.97E+08
30	1.10E+09	5.00E+09	8.60E+08	5.00E+09
33	1.90E+09	1.70E+09	9.90E+08	1.43E+09
36	1.00E+09	2.33E+09	9.90E+08	1.30E+09
48	1.40E+09	5.70E+09	1.20E+09	5.47E+09

Bt24	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	1.40E+07	5.40E+06	1.40E+04	
3	2.00E+08	2.20E+07	2.10E+05	3.00E+05
6	1.10E+09	2.27E+08	4.30E+05	7.50E+05
9	9.40E+08	3.90E+08	6.50E+05	3.00E+06
12	1.10E+09	4.20E+08	8.00E+05	7.30E+06
15	8.00E+08	4.80E+08	1.20E+08	2.27E+08
18	8.80E+08	5.00E+08	3.00E+08	5.00E+08
21	1.80E+09	6.40E+08	8.00E+08	6.40E+08
24	2.60E+09	8.07E+08	2.30E+09	8.20E+08
27	3.10E+09	1.07E+09	2.50E+09	8.93E+08
30	4.00E+09	1.33E+09	2.70E+09	1.10E+09
33	4.80E+09	1.83E+09	2.60E+09	1.40E+09
36	3.60E+09	2.03E+09	1.30E+09	1.53E+09
48	3.20E+09	2.60E+09	2.20E+09	1.83E+09

Bta	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	1.30E+07	7.43E+06	2.70E+04	
3	2.00E+08	6.57E+07	2.40E+05	1.50E+04
6	8.40E+08	1.84E+08	2.80E+05	1.67E+05
9	7.00E+08	4.83E+08	9.30E+05	1.50E+06
12	6.80E+08	5.07E+08	3.00E+07	3.00E+06
15	1.50E+09	5.30E+08	3.00E+08	5.00E+07
18	2.60E+09	6.00E+08	6.00E+08	2.29E+08
21	1.40E+09	6.80E+08	9.00E+08	6.70E+08
24	2.90E+09	7.30E+08	1.90E+09	6.83E+08
27	5.20E+09	8.50E+08	5.50E+09	7.63E+08
30	4.70E+09	1.07E+09	3.60E+09	1.03E+09
33	9.50E+09	2.93E+09	9.00E+09	1.30E+09
36	5.60E+09	3.20E+09	5.30E+09	1.40E+09
48	3.30E+09	3.40E+09	3.30E+09	1.53E+09

Btk	Cellules		Spores	
Temps	Soya	Boues	Soya	Boues
0	3.60E+06	3.20E+06		
3	7.57E+06	1.10E+07	2.60E+04	3.00E+05
6	4.20E+07	7.60E+07	2.00E+05	7.50E+05
9	5.20E+07	1.87E+08	5.00E+05	3.00E+06
12	5.70E+07	2.37E+08	1.00E+06	9.33E+06
15	9.50E+07	4.17E+08	3.00E+07	2.57E+07
18	1.14E+08	6.67E+08	1.05E+08	3.00E+08
21	1.34E+08	7.70E+08	1.03E+08	6.03E+08
24	1.57E+08	8.70E+08	1.52E+08	8.37E+08
27	3.27E+09	9.30E+08	1.92E+08	8.93E+08
30	3.47E+09	1.57E+09	2.30E+09	1.10E+09
33	3.57E+09	1.87E+09	2.37E+09	1.40E+09
36	4.00E+09	2.33E+09	2.40E+09	1.53E+09
48	4.67E+09	2.40E+09	2.80E+09	1.79E+09

ANNEXE C

Activité enzymatique obtenue pour différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 h

Bt4		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.17	0.11
3	0.32	0.14
6	0.63	0.92
9	2.41	1.61
12	2.92	1.69
15	2.67	1.65
18	2.26	1.62
21	2.23	1.97
24	2.22	2.18
27	2.62	1.97
30	2	2.38
33	2.13	2.12
36	1.67	2.25
48	1.92	2.27

Bt6		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.13	0.15
3	0.59	0.23
6	2.15	0.52
9	3.49	1.44
12	0.45	1.58
15	0.33	1.65
18	0.33	1.51
21	0.47	1.43
24	0.32	1.16
27	0.48	1.36
30	0.38	1.23
33	0.3	1.29
36	0.47	1.05
48	0.47	0.78

Bt8		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.53	0.01
3	2.62	0.01
6	4.61	0.62
9	3.57	1.03
12	3.18	1.96
15	3.51	1.54
18	3.34	1.58
21	3.52	0.90
24	3.18	1.39
27	2.76	1.75
30	2.73	1.35
33	2.51	1.15
36	2.11	1.16
48	1.96	0.21

Bt12		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.26	0.01
3	0.29	0.01
6	1.18	0.21
9	2.64	0.38
12	2.56	0.25
15	2.70	0.98
18	1.79	0.80
21	1.28	0.08
24	0.87	0.12
27	0.76	0.03
30	0.70	0.36
33	0.75	0.84
36	0.83	1.00
48	0.89	1.25

Bt14		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.05	0.28
3	0.36	0.54
6	0.536	1.09
9	0.612	1.08
12	4.021	1.08
15	4.23	0.90
18	3.322	0.76
21	3.294	1.00
24	1.354	1.34
27	2.357	1.51
30	0.297	1.66
33	0.177	1.89
36	0.215	2.13
48	0.928	1.93

Bt21		
Temps (heures)	**Act enz. (UI/ml)**	
	Soya	**Boues**
0	0.17	0.05
3	2.66	0.58
6	4.50	0.70
9	3.47	1.11
12	3.96	0.94
15	3.93	0.51
18	3.66	1.56
21	3.66	1.58
24	3.59	1.48
27	3.24	1.94
30	2.90	1.87
33	3.25	2.34
36	2.92	3.16
48	2.75	3.37

Bt24		
Temps (heures)	Act enz. (UI/ml)	
	Soya	Boues
0	0.52	0.00
3	0.8705	0.06
6	0.9326	0.04
9	1.883	0.04
12	3.2586	0.24
15	1.8113	1.04
18	1.3226	1.20
21	1.2877	0.82
24	2.1079	1.90
27	2.0734	1.85
30	2.1046	2.24
33	2.0042	2.07
36	1.9514	2.21
48	2.2946	2.29

Bta		
Temps (heures)	Act enz. (UI/ml)	
	Soya	Boues
0	0.07	0.21
3	0.15	0.31
6	0.41	0.41
9	1.91	0.48
12	2.95	0.53
15	2.83	0.64
18	0.94	0.42
21	1.25	0.35
24	1.02	0.41
27	1.00	0.70
30	1.27	0.73
33	1.25	0.83
36	1.13	0.79
48	1.24	1.08

Btk		
Temps (heures)	Act enz. (UI/ml)	
	Soya	Boues
0	0.00	0.00
3	0.00	0.00
6	0.14	0.06
9	0.89	0.10
12	2.39	0.41
15	1.37	0.58
18	1.19	0.65
21	1.21	1.30
24	1.93	1.50
27	1.89	1.68
30	1.76	1.92
33	2.04	1.87
36	2.33	2.03
48	2.56	2.13

ANNEXE D

Effets du pH et de la température sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Bt4 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.79	0.86	1.38	1.63	1.18
7	0.86	2.06	3.22	3.44	1.21
8	1.14	2.41	2.70	0.98	0.58
9	1.26	2.38	2.86	1.01	0.60
10	0.92	1.58	1.86	0.60	0.29
11	0.92	2.17	2.88	1.18	0.69
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04

Bt4 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.46	0.55	1.49	2.86	1.23
7	1.13	2.10	3.53	5.06	0.76
8	1.13	2.29	2.54	0.98	0.19
9	1.15	2.66	3.51	1.68	0.43
10	0.52	0.96	0.62	0.62	0.58
11	1.36	2.95	4.93	4.71	0.53
12	0.08	0.10	0.02	0.58	0.48

Bt6 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.27	0.17	0.20	0.25	0.25
7	0.32	0.12	0.09	0.38	0.00
8	0.22	0.16	0.00	0.40	0.70
9	0.12	0.28	0.06	0.17	0.15
10	0.11	0.00	0.08	0.30	0.50
11	0.39	0.19	0.00	0.29	0.19
12	0.31	0.00	0.00	0.16	0.27

Bt6 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.35	0.65	1.45	2.51	0.01
7	0.95	1.90	3.19	4.25	0.02
8	0.54	1.66	2.22	0.78	0.00
9	0.92	2.22	2.92	1.20	0.01
10	0.47	0.77	0.41	0.25	0.00
11	1.15	2.58	4.34	3.85	0.02
12	0.08	0.13	0.01	0.15	0.00

Bt8 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	1.00	1.15	2.44	2.41	2.05
7	1.61	2.83	1.28	3.79	2.86
8	2.30	3.14	4.09	1.92	0.97
9	2.09	3.53	3.01	1.70	0.80
10	2.04	3.24	3.92	1.10	0.65
11	1.90	3.69	3.81	2.34	1.11
12	0.32	0.09	0.00	0.27	0.26

Bt8 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.42	0.68	1.25	2.01	1.20
7	1.16	1.99	3.12	3.60	0.99
8	1.13	1.75	2.87	2.77	0.87
9	1.31	2.73	4.33	2.03	0.50
10	0.67	1.72	1.39	0.74	0.41
11	1.32	2.72	4.47	4.47	0.87
12	0.20	0.35	0.18	0.78	0.15

Bt12 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.44	0.77	0.75	0.80	0.89
7	0.42	0.91	0.77	0.60	0.47
8	0.24	0.53	0.75	0.69	0.58
9	0.27	0.47	0.51	0.49	0.40
10	0.22	0.25	0.34	0.00	0.47
11	0.26	0.33	0.81	0.11	0.48
12	0.00	0.00	0.00	0.04	0.45

Bt12 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.23	0.29	0.46	0.51	0.39
7	0.26	0.61	0.78	0.92	0.53
8	0.26	0.57	0.46	0.59	0.89
9	0.45	0.55	0.88	0.63	0.44
10	0.21	0.21	0.35	0.81	0.81
11	0.46	0.81	1.13	1.07	0.57
12	0.08	0.21	0.07	0.25	0.15

Bt14 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.00	0.21	0.09	0.40	0.41
7	0.27	0.23	0.11	0.47	0.25
8	0.25	0.00	0.74	0.38	0.75
9	0.00	0.40	0.00	0.28	0.19
10	0.00	0.00	0.00	0.28	0.23
11	0.00	0.21	0.06	0.10	0.12
12	0.00	0.22	0.05	0.07	0.45

Bt14 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.31	0.64	1.77	2.10	0.98
7	0.84	1.62	2.47	2.34	0.51
8	0.96	1.71	2.04	0.59	0.21
9	1.28	2.45	3.52	2.08	0.35
10	1.00	1.94	2.28	0.63	0.08
11	1.20	2.29	3.10	2.58	0.47
12	0.33	0.78	0.49	0.03	0.05

Bt21 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.00	1.92	2.04	2.16	2.31
7	0.00	3.46	3.87	3.72	2.57
8	0.00	3.05	2.88	1.76	1.46
9	0.00	4.36	3.62	1.92	1.28
10	0.00	4.23	2.70	1.43	1.25
11	0.00	3.22	3.60	2.03	1.85
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.44

Bt21 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.43	0.82	1.44	2.17	2.25
7	1.30	2.19	3.38	4.53	2.00
8	1.32	1.92	3.15	2.24	0.27
9	1.72	3.02	4.49	5.16	0.78
10	1.34	2.35	2.93	1.29	0.61
11	1.61	2.64	4.59	5.47	2.16
12	0.42	1.30	0.23	0.28	0.13

Bt24 SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.65	0.84	1.76	2.44	1.22
7	1.20	1.57	2.68	3.15	1.49
8	1.19	1.83	2.39	1.24	0.66
9	1.19	2.01	2.68	1.11	0.51
10	0.72	1.60	1.72	0.70	0.59
11	1.03	2.07	2.29	1.42	0.61
12	0.05	0.05	0.00	0.25	0.16

Bt24 BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.23	0.51	0.88	0.93	0.42
7	0.91	1.36	1.92	1.31	0.81
8	1.31	1.97	2.72	2.60	0.65
9	1.28	2.14	2.80	1.31	0.39
10	0.74	1.73	1.81	0.10	0.29
11	1.21	2.01	3.03	1.44	0.49
12	0.75	0.49	1.07	0.44	0.35

Bta SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.29	1.23	1.95	2.16	2.30
7	0.00	1.63	3.39	3.57	1.82
8	0.00	1.87	2.53	1.17	0.85
9	0.00	2.26	2.83	1.28	0.97
10	0.00	1.79	2.44	0.70	0.90
11	0.00	2.38	3.21	1.19	0.88
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14

Bta BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.16	0.27	0.47	0.64	0.37
7	0.36	0.62	0.93	0.77	0.22
8	0.60	0.85	0.37	0.08	0.24
9	0.37	0.90	1.40	0.56	0.19
10	0.30	0.57	0.63	0.11	0.08
11	0.38	0.83	1.40	0.92	0.19
12	0.20	0.18	0.24	0.02	0.05

Btk SOYA					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.79	0.66	0.65	0.88	0.82
7	1.29	1.64	1.74	1.05	0.51
8	2.06	2.36	2.50	1.31	0.58
9	1.43	2.68	2.64	0.64	0.37
10	0.52	2.01	1.82	0.44	0.42
11	1.68	2.49	2.56	0.98	0.64
12	0.10	0.80	0.28	0.31	0.53

Btk BIOSOLIDES					
pH	**30oC**	**40oC**	**50oC**	**60oC**	**70oC**
6	0.33	1.08	1.09	0.82	0.62
7	1.09	2.65	1.94	1.44	0.84
8	1.50	3.36	3.07	2.89	0.84
9	1.63	3.91	3.15	1.62	0.48
10	1.08	2.17	1.30	0.45	0.43
11	1.45	3.71	3.04	1.70	0.70
12	0.97	0.49	0.10	0.82	0.53

ANNEXE E

Effets de la température et des ions Ca^{2+} sur l'activité enzymatique résiduelle (%) de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

Bt4				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	98.3	95.1	90.5	99.4
60	95.3	93.8	81.9	93.9
90	95.3	92.6	75.2	91.5
120	85.9	84.6	71.9	80.5
150	80.0	84.0	68.1	82.3

Bt6				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	100.0	99.3	80.9	90.7
60	96.6	97.7	33.3	76.7
90	82.8	97.7	31.0	71.3
120	79.3	91.0	28.6	60.7
150	75.9	87.2	26.2	53.3

Bt8				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
30	100.0	100.0	100.0	100.0
60	99.1	100.0	79.0	89.1
90	95.4	92.7	77.7	85.0
120	95.0	93.3	75.3	83.0
150	95.4	85.4	67.0	78.2
180	94.0	85.4	60.2	72.1

Bt12				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	90.4	92.7	72.6	97.3
60	84.0	73.2	69.9	84.4
90	67.0	68.3	68.5	78.2
120	60.6	58.5	58.9	63.3
150	55.3	56.1	58.9	49.7

Bt14				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	96.2	83.3	52.2	86.6
60	73.1	85.2	41.3	83.1
90	69.2	89.5	32.6	47.2
120	42.3	87.7	11.9	37.3
150	34.6	88.9	3.3	35.9

Bt21				
Temps (minutes)	$CaCl_2$		Thermostabilité	
	Soya	Boues	Soya	Boues
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	90.4	99.6	77.8	72.8
60	90.4	98.7	69.4	59.2
90	89.0	83.3	66.2	41.2
120	86.3	82.0	66.2	32.0
150	80.8	77.6	61.7	26.5

Bt24				
Temps (minutes)	**$CaCl_2$**		**Thermostabilité**	
	Soya	**Boues**	**Soya**	**Boues**
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	77.3	99.5	71.9	95.2
60	61.4	98.4	71.3	92.2
90	75.0	100.0	65.4	91.6
120	86.4	93.1	64.2	90.4
150	93.2	90.4	47.1	89.6

Bta				
Temps (minutes)	**$CaCl_2$**		**Thermostabilité**	
	Soya	**Boues**	**Soya**	**Boues**
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	62.5	100.0	82.6	92.8
60	85.7	100.0	77.0	81.9
90	71.4	100.0	60.3	56.6
120	83.9	100.0	54.0	51.8
150	85.7	100.0	48.4	42.2

Btk				
Temps (minutes)	**$CaCl_2$**		**Thermostabilité**	
	Soya	**Boues**	**Soya**	**Boues**
0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	97.7	100.0	82.1	99.1
60	97.1	100.0	74.4	96.9
90	82.6	98.3	42.3	95.1
120	81.3	98.3	28.9	95.1
150	79.0	96.5	26.3	90.5

ANNEXE F

Étude du phénomène de réactivation de l'activité enzymatique chez différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures suite à l'exposition prolongée des échantillons à une température de 50°C.

Échantillon Bt4	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	1.43	1.35
Réactivation	0.78	0.33

Échantillon Bt6	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	0.11	1.50
Réactivation	0.25	0.44

Échantillon Bt8	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	1.95	0.91
Réactivation	1.02	0.28

Échantillon Bt12	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	0.43	0.03
Réactivation	0.18	0.29

Échantillon Bt14	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	0.03	0.51
Réactivation	0.32	0.63

Échantillon Bt21	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	3.25	4.49
Réactivation	1.78	2.00

Échantillon Bt24	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	1.59	1.70
Réactivation	1.11	0.48

Échantillon Bta	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	1.39	0.35
Réactivation	0.82	0.47

Échantillon Btk	**Act enz. (UI/ml)**	
	SOYA	**BOUES**
Après 180 min	0.41	2.01
Réactivation	0.07	0.57

ANNEXE G

Effets de l'action des inhibiteurs (EDTA et PMSF) sur l'activité enzymatique de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Échantillon Bt4	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	95.9	62.0
PMSF	52.2	19.8

Échantillon Bt6	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	80.2	60.6
PMSF	83.9	4.5

Échantillon Bt8	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	93.0	66.1
PMSF	57.7	4.1

Échantillon Bt12	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	87.7	86.6
PMSF	71.3	47.2

Échantillon Bt14	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	63.2	68.5
PMSF	57.5	32.4

Échantillon Bt21	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	95.6	91.7
PMSF	63.7	58.7

Échantillon Bt24	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	87.5	71.9
PMSF	39.6	14.1

Échantillon Bta	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	74.7	76.0
PMSF	59.9	53.8

Échantillon Btk	**Act enz.résiduelle (%)**	
	SOYA	**BOUES**
EDTA	95.8	93.1
PMSF	37.6	26.0

ANNEXE H

Entomotoxicité (UI) sur des larves de la tordeuse des bourgeons de l'épinette de différentes souches de *Bacillus thuringiensis* cultivées en milieu soya et en biosolides dans un fermenteur de 15 litres pendant 48 heures.

Souche	**Milieu Soya**	**Biosolides après 36h**	**Biosolides après 48h**
Bt4	12200	15373	13202
Bt6	12002	13202	13535
Bt8	10308	12087	11149
Bt12	11392	14317	15099
Bt14	13569	15217	13926
Bt21	12096	16214	14082
Bt24	11424	12322	12987
Bta	13221	15706	14317
Btk	11589	12713	12420