

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

Examineur Externe

**Madame Nicole Benhamou
Faculté des sciences de l'agriculture
Et de l'alimentation**

Examineur 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 se 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> (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 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>.....	84
4.6.1 Bt var. <i>kurstaki</i>	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 <i>cry</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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 <i>Bacillus thuringiensis</i> 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.

INTRODUCTION

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 sa 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 présente 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-positif, 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.

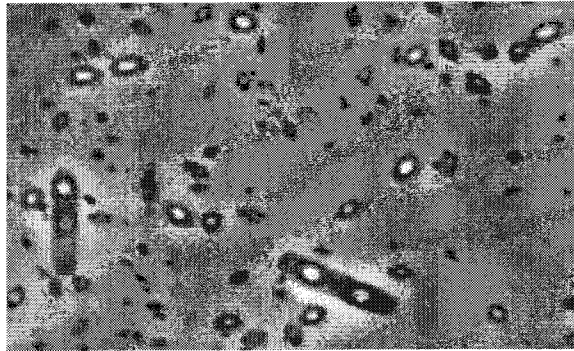


Figure 1 : Cellules et spores de Bt

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 stimulaient 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (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