

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 80 20178

⑤④ Microémulsion de substances nutritives, assimilables par des microorganismes, son procédé de préparation, et ses applications.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 1/20; C 09 K 3/32; C 12 N 1/14.

②② Date de dépôt 19 septembre 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 26-3-1982.

⑦① Déposant : SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE (PRODUCTION), Société anonyme dite,
résidant en France.

⑦② Invention de : Jacques Tellier, André Sirvins, Jean-Claude Gautier et Bernard Tramier.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Société nationale ELF Aquitaine, Département Propriété Industrielle,
Tour Aquitaine, 92080 Paris La Défense cedex 4.

La présente invention concerne un nouveau type de microémulsion, à savoir la microémulsion thermodynamiquement stable d'une solution aqueuse de matières nutritives, dont la phase externe est constituée par un milieu hydrophobe. Elle comprend un procédé de production d'une telle
5 microémulsion et des applications de celle-ci dans des domaines d'utilisation de microorganismes, notamment à la culture des microorganismes dans un milieu hydrophobe.

Des opérations industrielles, mettant en oeuvre des cultures de divers microorganismes, surtout bactéries et champignons, sont très courantes à l'heure actuelle. Nombreuses industries alimentaires, fabrica-
10 tions de médicaments, épurations, etc... sont basées sur de telles opérations. Le plus souvent, le travail comporte deux temps : d'abord a lieu la culture du microorganisme concerné, dans un milieu nutritif approprié, jusqu'à la croissance d'une population suffisamment nombreuse ; dans la
15 seconde étape, cette population est mise au contact des matières que l'on veut soumettre à l'action des microorganismes. Les opérations en cuve ne comportent pas de difficultés spéciales à ce point de vue, la culture préalable, c'est-à-dire la multiplication, étant effectuée -selon les cas- dans une enceinte séparée ou dans la même cuve où a lieu la seconde phase
20 opératoire. Par contre, lorsque les opérations sont réalisées dans la nature, sur des grandes surfaces de sol ou d'eau, comme c'est par exemple le cas dans l'élimination de nappes d'hydrocarbures par dégradation microbiologique en mer, sur des plages, sur des cours d'eau ou des lacs, la multiplication préalable des microorganismes utiles présente des difficultés.
25 On doit, en effet, fournir à la culture des matières nutritives, c'est-à-dire des sources de C, N et P, ainsi que des oligoéléments, pour assurer la croissance des organismes en question ; or les sources classiques, telles qu'hydrates de carbone, nitrates ou sels ammoniacaux et phosphates sont solubles dans l'eau, ils ne peuvent donc pas demeurer dans la couche
30 superficielle de l'étendue à traiter, où doit avoir lieu une forte croissance des microorganismes utiles ; ces substances diffusent dans l'eau ou le sol sous-jacent et sont ainsi soustraites à la culture.

Pour y remédier, on a appliqué, jusqu'à présent, différentes méthodes. Une d'entre elles consiste à enrober de paraffine des grains de
35 composé azoté et de phosphate solides, pour les offrir sous cette forme

aux microorganismes, comme indiqué dans le brevet US 3 959 127. Dans une variante, selon le brevet US 3 883 397, l'enrobage lipophile est un sel d'acide gras, à la place de la paraffine. Mais ces méthodes ne permettent pas aux microorganismes d'avoir rapidement à leur disposition la nourriture voulue ; la matière grasse d'enrobage est difficile à percer, c'est-à-dire à dégrader, en l'absence d'azote et de phosphore extérieurs. Aussi l'action des bactéries ou des champignons est-elle lente et demande des semaines ou des mois. Une autre solution proposée consiste à utiliser en tant que sources de N et P, des composés insolubles dans l'eau, mais solubles dans les hydrocarbures, notamment des phospho-amino-lipides, comme décrit dans la publication française N° 2 172 796 de brevet ; mais les composés azotés solubles dans l'huile ont en général une assez faible teneur en azote, et dans ces conditions, la dégradation biologique des hydrocarbures du pétrole, en mer, demande 2 à 3 mois. On a également indiqué, dans la publication française N° 2 230 401, l'emploi d'amides, de sels organiques d'ammonium et de phospho-amino-lipides en solution dans un solvant pétrolier, cette solution étant mise en émulsion dans l'eau ; cette émulsion est pulvérisée sur une nappe d'hydrocarbure flottant sur l'eau, en vue de la biodégradation de la nappe. Cette méthode exige des fortes proportions d'émulsion aqueuse et le résultat n'est acquis qu'après plusieurs semaines.

La présente invention réalise une solution nouvelle de l'apport de substances nutritives, solubles dans l'eau, à une couche organique hydrophobe. Que cette couche -qui peut être hydrocarbonnée- flotte sur l'eau ou qu'elle se trouve sur le sol ou sur un support en matériau de construction, les substances nutritives, apportées selon l'invention restent principalement dans la couche hydrophobe et permettent la multiplication rapide des microorganismes, si des germes de ceux-ci s'y trouvent.

Le nouveau procédé suivant l'invention consiste à créer une micro-émulsion du type eau-dans-huile, dont la phase interne est une solution aqueuse de matières nutritives et la phase externe un liquide non miscible à l'eau, et à ajouter cette microémulsion à la couche hydrophobe qu'il s'agit de dégrader ; la microémulsion peut renfermer les germes des microorganismes appropriés si le milieu à traiter n'en contient pas, ou n'en contient pas suffisamment.

Bien entendu, comme connu dans l'art, la microémulsion contient au moins un agent tensioactif et un co-agent, qui ont servi à sa préparation.

Ainsi, contrairement à la technique antérieure, les substances nutritives ne sont utilisées ni à l'état solide, ni en solution dans un solvant non miscible à l'eau, ni en macroémulsion aqueuse, mais sous la forme d'une solution aqueuse microémulsionnée dans un liquide miscible avec la couche hydrophobe à biodégrader, c'est-à-dire sous la forme de micelles micro-dispersées, dites inversées dont le diamètre est compris entre 80 et 600 Angströms et particulièrement entre 100 et 200 Angströms. Cette forme inattendue conduit à ce résultat remarquable que la biodégradation peut être réalisée en quelques jours, au lieu des semaines ou mois que demandent les procédés connus.

En tant que source d'azote on peut employer, dans les microémulsions suivant l'invention, les différents composés, solubles dans l'eau, assimilables par les microorganismes. Ce sont par exemple les nitrate, sulfate ou/et phosphate d'ammonium, l'urée, des protéines, peptones, etc. L'urée étant l'engrais le plus riche en azote et très soluble dans l'eau, elle est particulièrement appropriée, puisqu'elle permet d'avoir des solutions aqueuses fortement concentrées.

Le phosphore peut être apporté à la solution de même sous une de ses formes habituelles, phosphates ou phosphites alcalins ou d'ammonium. Suivant une forme d'exécution particulière de l'invention, le phosphore est pris sous la forme d'un composé tensioactif, tel que par exemple un phosphate d'alkyle supérieur ou une lécithine : on a ainsi la source de phosphore et l'agent tensioactif de la microémulsion dans la même molécule.

Dans de nombreuses opérations industrielles comportant la culture de microorganismes il est nécessaire que le pH du milieu soit ajusté à la valeur la plus favorable à la croissance bactérienne ; en général ce pH doit être voisin de la neutralité, et l'on peut ajouter soit de l'acide phosphorique, source de phosphore, si le milieu doit être acidifié, ou bien de l'ammoniaque, source d'azote, si le milieu doit être neutralisé par une base.

Dans le cas de la dégradation bactérienne des hydrocarbures par les microorganismes cités ci-dessous, les besoins en phosphore sont beau-

coup moindres qu'en azote ; exprimé en poids, le rapport P/N peut varier entre 0,02 et 0,2, de préférence entre 0,05 et 0,15 ; au point de vue de la croissance, les rapports P/N les plus favorables sont aussi proches que possible de 0,05.

5 Lorsque le liquide non miscible à l'eau, de préférence lipomiscible, formant la phase externe de la microémulsion, ou bien la couche hydrophobe à dégrader, est utilisable par les microorganismes en tant que source de carbone, il n'est plus nécessaire d'ajouter d'autres composés carbonés, assimilables, à la microémulsion. Par contre, si la phase
10 externe de celle-ci et la couche à dégrader sont difficilement attaquées par les microorganismes -du moins au début- il y a intérêt à inclure dans la solution nutritive une source de carbone facile à utiliser, par exemple des hydrates de carbone solubles, permettant ainsi le démarrage rapide de la multiplication des microorganismes.

15 Comme dans toutes les cultures, des oligoéléments sont nécessaires en particulier des sels de Fe, Mg, K, etc..., il y a donc lieu d'en ajouter une très petite dose à la solution nutritive, à la manière connue en soi.

 Il va de soi que, pour obtenir une microémulsion suivant l'inven-
20 tion, on doit utiliser un composé tensioactif capable d'en produire une. Le choix du composé idoine, à la portée de l'homme de l'art, peut être fait parmi les nombreux groupes de tensioactifs non toxiques pour les microorganismes en présence. Ainsi peut-on employer par exemple des sulfates d'alcools gras, des sulfosuccinates, des esters oxyéthylénés de sorbi-
25 tan, des alcools, acides ou huiles oxyéthylénés, esters de saccharose, amino-acides, α -amido amino-acides, taurines, sarcosines, polyglycols, phosphates d'alkyles lourds, etc... Cette énumération n'a rien de limitatif, bien d'autres tensioactifs pouvant être utilisés, en particulier ceux qui ont des propriétés dispersantes vis à vis des hydrocarbures.

30 De préférence, la balance hydrophile-lipophile des agents émulsifiants employés est comprise entre 10 et 17, ou mieux entre 11 et 15.

 Lorsqu'il s'agit d'opérations menées dehors, l'agent tensioactif lui-même doit être biodégradable, afin d'éviter des nuisances dans la nature.

35 Comme pour les tensioactifs, le choix est également vaste en ce

qui concerne le co-tensioactif nécessaire à la formation de la micro-émulsion. De tels co-agents sont connus dans l'art, il n'y a donc pas lieu d'en citer beaucoup ici ; on notera seulement, à titre d'indication non limitative, qu'il est possible d'employer des composés azotés, tels
5 que carbamates, amides ou sels d'amines. La viscosité de la microémulsion peut être considérablement abaissée par l'adjonction d'un alcool, en particulier en C_6 à C_{12} , d'un ether ou d'un ester de polyol, notamment de glycol ; cela facilite beaucoup les manipulations.

Puisque la phase externe de la microémulsion doit être miscible
10 avec le liquide hydrophobe à biodégrader, elle est forcément choisie selon la nature de ce liquide. Dans le cas pratique le plus important, où ce dernier est constitué par des hydrocarbures du pétrole, la phase externe, lipomiscible, peut être consitutée par exemple par des hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou naphéniques, ou par des huiles dites minérales,
15 c'est-à-dire des mélanges de tels hydrocarbures. Ce type de phase externe est difficilement attaquée par des bactéries, tant que celles-ci n'ont pas subi l'adaptation suffisante. Il est donc préférable d'utiliser des huiles végétales ou animales qui peuvent servir de source de carbone, parce qu'elles sont utilisables par les microorganismes ; ces huiles, ou de pré-
20 férence leurs acides gras correspondants, permettent un développement rapide des microorganismes nécessaires à la dégradation de la couche hydrophobe, notamment du pétrole brut.

Le rapport pondéral entre le liquide lipomiscible, c'est-à-dire la phase externe de la microémulsion, et la solution aqueuse à émulsionner,
25 doit en général être supérieur à 0,2 ; ce rapport est choisi de façon à ce que la solution aqueuse se trouve en phase interne. Le choix des tensioactifs et des co-tensioactifs est effectué selon la nature du liquide lipomiscible et suivant la concentration des sels dissous dans la phase aqueuse ; on se base pour cela sur les concepts de formulation des micro-
30 émulsions, connus en soi.

Le procédé de l'invention est applicable à un grand nombre de microorganismes et en particulier à ceux qui permettent de dégrader des hydrocarbures ; ainsi peut-on appliquer l'invention à l'utilisation des bactéries telles que Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Arthro-
35 bacter, Corynebactérium, etc... Les microorganismes peuvent également être

des champignons.

Bien que l'invention soit très intéressante pour les différentes opérations de biodégradation effectuées dehors, elle peut également rendre des services dans diverses fabrications en cuve, chaque fois qu'une
5 couche hydrophobe d'une substance est mise en jeu dans le procédé. Ainsi, par exemple, s'applique-t-elle avec avantage à la fabrication de protéines à partir d'hydrocarbures par dégradation de ces derniers, à l'aide de bactéries et/ou de champignons. Dans tous les cas, la remarquable dispersion des substances nutritives, aqueuses, au sein de la phase hydrophobe, obtenue grâce à l'invention, conduit à une multiplication plus rapide des
10 microorganismes ; il en résulte un gain de temps appréciable dans les opérations.

Parmi les applications au grand air, sur des surfaces d'eau ou de sol, la plus importante est la dégradation des hydrocarbures répandus accidentellement ; pour la raison exposée plus haut, c'est-à-dire du fait
15 que les substances nutritives solubles restent dans la couche traitée au lieu d'être entraînées par l'eau, l'invention présente une grande valeur pour la lutte contre la marée noire. Cependant, le même principe s'applique à des opérations telles que nettoyage des chaussées, bassins, sols,
20 cuves, etc..., des dépôts hydrocarbonés qui peuvent les souiller. D'autres applications comprennent l'épandage d'engrais sur des cultures agricoles.

Les microorganismes sont généralement présents dans le milieu à traiter ; il est cependant nécessaire parfois d'effectuer un ensemencement, lorsque la population initiale est jugée trop faible, ou bien si le milieu
25 ne contient pas les bactéries appropriées.

Dans une forme particulière d'exécution de la présente invention, on utilise l'urée comme substance nutritive azotée ; on a constaté que ce composé joue en même temps le rôle de co-tensioactif, on n'est donc plus obligé d'ajouter un autre co-tensioactif. D'autre part, comme le phosphore
30 peut avantageusement être apporté par des esters alkyliques de l'acide phosphorique, qui jouissent des propriétés tensioactives, la composition de la solution nutritive est simplifiée par le fait qu'il est possible d'employer l'urée et l'ester phosphorique, sans autre adjuvant. Il est cependant recommandable d'ajouter des liquides permettant d'abaisser la
35 viscosité de la microémulsion ; on a cité plus haut quelques exemples de tels adjuvants ; dans une forme d'exécution particulière de l'invention,

le butyléther d'éthylène glycol a donné d'excellents résultats.

Le liquide lipomiscible, convenant fort bien pour la phase externe de la microémulsion, suivant l'invention, peut être constitué par un ou plusieurs esters d'acide gras, tels que les acides laurique, myristique, 5 palmitique, arachidique, oléique, stéarique, caprique, caproïque, caprylique, etc... ; les glycérides de tels acides constituent des produits industriels très accessibles, puisque ce sont des huiles végétales et animales. Des alcools gras, c'est-à-dire en C_6 à C_{24} conviennent également, ainsi que les acides gras liquides, eux-mêmes.

10 Dans un cas particulier, où la solution aqueuse contient de l'urée et des phosphates de lauryle ou/et d'oléyle commercialisés par exemple par la Société Hoechst sous le nom "Hostaphalt", la teneur préférée en azote de l'ensemble de la microémulsion est d'environ 4 à 10 % en poids ou mieux de 5 à 7 %. Le rapport pondéral de l'azote sur le liquide lipomiscible est 15 généralement de 0,1 à 0,4 et surtout de 0,11 à 0,31.

L'invention est illustrée par la série d'exemples non limitatifs qui suivent.

EXEMPLES 1 à 11

Pour chacun des essais, on mélange un certain volume de solution 20 aqueuse d'urée à 50 % en poids avec un volume d'acide oléique, en présence d'une certaine quantité de tensioactifs constitués par un mélange d'esters phosphoriques d'alcools gras de C_{12} à C_{18} commercialisés par la Société Hoechst sous les noms de "Hostaphat". Dans certains de ces essais, on ajoute également du butyl-éther d'éthylène glycol pour abaisser la visco- 25 sité.

On détermine le domaine des températures dans lequel la micro-émulsion obtenue est stable.

Le tableau 1, ci-après, indique les compositions des microémulsions ainsi préparées, les domaines de stabilité de ces dernières et leur visco- 30 sité.

On peut voir qu'une excellente stabilité dans le domaine de 0°C à plus de 40°C peut être obtenue suivant les exemples 4, 5, 6, 8, 10 et 11. En ce qui concerne la viscosité, on constate que sans adjonction de butyl-éther d'éthylène glycol, elle est très forte (exemple 1 et 2) ; par contre, cette adjonction la ramène à des valeurs très acceptables 35 (exemples 3 à 11).

5
10
15
20
25
30
35

T A B L E A U 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Eau	11,1	11,7	13,8	14,4	18,3	20,1	20,9	21,9	19,2	20,2	19,2
Urée	11,1	11,7	13,8	14,4	18,3	20,1	20,9	17,2	15,8	16,6	15,7
Acide oléique	44,4	46,7	36,8	38,4	36,6	32,1	27,9	27,9	28	29,4	28
Butyl-éther d'éthylène glycol	0	0	10,6	9,8	10,7	11,6	14,4	14,4	17,5	16,2	10,5
Phosphate de lauryle (KL 340)	33,3	-	25	-	-	-	-	-	19,5	8,8	19,5
Phosphate d'oléyle (KO 380)	-	30	-	23	-	-	-	-	-	-	-
Phosphate d'alkyl phénol éthoxylé	-	-	-	-	16,1	16,1	15,9	15,9	-	8,8	-
Phosphate mono ammonique	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
% azote	5,2	5,45	6,44	6,72	-	-	-	-	7,4	-	-
Rapport azote/acide oléique	0,117	0,117	0,175	0,175	0,23	0,29	0,35	0,31	0,26	0,26	0,26
Rapport phosphore/azote	0,154	0,064	0,09	0,043	0,099	0,09	0,086	0,063	0,064	-	-
Domaine de stabilité °C	10-44	10-46	1-44	0-44	0-40	0-47	12-57	0-40	0-36	0-42	0-45
Viscosité en cps à 20°C	1200	2000	167	265	203	197	141	98	61	-	-

EXEMPLES 12 à 16

Des microémulsions ont été préparées avec 33 % de phosphate de lauryle ; le liquide lipomiscible est l'acide oléique dont la quantité est égale à deux fois la solution aqueuse d'urée et de phosphate. On a fait varier le pourcent d'urée dans la phase aqueuse. Les résultats ci-dessous donnent la température maximale à laquelle la microémulsion est encore stable.

	% d'urée dans la phase aqueuse	Limite supérieure de Température °C
10	22,2	36
	25	32
	33	38
	50	35
	56	Pas de microémulsion

Ces résultats montrent que des microémulsions pratiquement viables, stables jusqu'environ 36°C, peuvent être obtenues avec des concentrations en urée allant jusqu'à 50 %, mais non pas au-delà.

EXEMPLES 17 à 19

Avec une solution aqueuse à 50 % d'urée et l'addition de phosphate d'oléyle renfermant 30 % de mono-éthyl-éther de l'éthylène glycol, on a préparé trois microémulsions renfermant des proportions variables d'acide oléique. Voici les domaines de stabilité de ces produits.

	Rapport pondéral solution d'urée/acide oléique	Tensioactif (Phosphate d'oléyle)	Domaine de stabilité °C
25	0,5	25,3	0-65
	0,625	24,2	0-59
	0,75	26,7	Ogel-64

Il en résulte qu'au delà du rapport solution aqueuse/acide oléique d'environ 0,65, et pour une quantité fixée de mono-éthyl-éther de l'éthylène glycol de 30 %, la microémulsion est difficile à utiliser, puisqu'elle tend à se gélifier ; par contre, au-dessous de ce rapport, on constate une excellente stabilité.

DEGRADATION DES HYDROCARBURES DU PETROLEEXEMPLE 20

Dans un fermenteur de 50 litres, on introduit 30 l d'eau de mer sté-

rilisée à 120°C pendant 2 heures. Sur la surface de cette eau de mer, on répand 30 ml de pétrole brut de 34° API, contenant 75 % d'hydrocarbures saturés et 25 % d'aromatiques. La couche de pétrole a une épaisseur de 0,5 mm. Sur cette couche, on pulvérise 6 ml d'une des microémulsions des
 5 exemples précédents. Le milieu est ensuiteensemencé avec des germes provenant de l'eau de mer ; ces germes sont obtenus par culture pendant 24 h sur une solution aqueuse de glucose ; ils contiennent en majeure partie des Pseudomonas.

Après cette inoculation, on effectue la numération des germes dans
 10 des prélèvements de pétrole : on trouve ainsi $2,5 \times 10^3$ à 4×10^4 germes par ml.

On procède alors à la culture aérobie, en agitant le contenu du fermenteur avec un agitateur tournant à 400 t/mn, pendant que 120 litres d'air stérilisé sont soufflés, par heure ; cette aération correspond sensiblement à celle qui a lieu naturellement en mer.
 15

Après 48 h, une nouvelle numération est effectuée : ses résultats sont indiqués plus bas.

Après 7 jours, on détermine le taux de dégradation du pétrole, par extraction des hydrocarbures résiduels avec du CCl_4 et mesure à l'infra-
 20 rouge.

Voici les résultats obtenus avec les microémulsions des exemples 1, 2, 3, 10 et 11.

	Microémulsion de	Germes au départ	Germes après 48 h	Taux de dégradation
25	Ex. 1	$2,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^8$	83 %
	2	2×10^4	$9,5 \times 10^8$	90 %
	3	$1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^8$	90 %
	10	$4,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^8$	86 %
	11	$1,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^7$	92 %

30 EXEMPLE 21

On réalise un essai selon le même mode opératoire décrit dans l'exemple 20, mais on introduit dans le fermenteur une eau de mer non stérilisée, et le milieu n'est pasensemencé par des bactéries supplémentaires.

Les résultats sont les suivants :

Microémulsion de	Germes au départ	Germes après 48 h	Taux de dégradation
11	2×10^3	$5,5 \times 10^7$	82 %

EXEMPLE 22

5 On réalise un essai selon le mode opératoire décrit dans l'exem-
 ple 20, mais on remplace l'eau de mer par une eau naturelle dans laquelle
 on rajoute les différents constituants minéraux de l'eau de mer ainsi que
 30 ppm, oligoéléments tels que Fer, magnésium, potassium. On pulvérise
 6 ml de la microémulsion n) 11, et onensemence le milieu avec une culture
 10 de bactéries.

Après 7 jours on détermine le taux de dégradation du pétrole, par
 extraction des hydrocarbures résiduels avec du CCl_4 , et mesure à l'infra-
 rouge.

Le taux de dégradation est de 90 %.

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1.- Procédé de culture de microorganismes dans un milieu comprenant une matière hydrophobe, par l'emploi de substances nutritives en solution aqueuse, caractérisé en ce que cette solution est microémulsion-
5 née dans un liquide non miscible à l'eau, et la microémulsion, ainsi formée, est introduite dans ledit milieu contenant des germes des microorganismes à cultiver.

2.- Procédé suivant la revendication 1, dans lequel la solution nutritive contient des composés hydrosolubles de l'azote et des composés
10 hydrosolubles du phosphore, caractérisé en ce qu'on choisit, pour le liquide non miscible à l'eau, un liquide lipomiscible, renfermant des composés du carbone assimilables par les microorganismes concernés.

3.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les germes des microorganismes à cultiver préexistent dans le milieu hydro-
15 phobe dans lequel est introduite la solution microémulsionnée.

4.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les germes des microorganismes à cultiver, sont introduits sous forme d'une souche cultivée préalablement avec la solution microémulsionnée dans le milieu hydrophobe.

20 5.- Microémulsion pour l'apport de substances nutritives à une culture de microorganismes, caractérisée en ce que sa phase interne est constituée par une solution aqueuse d'un composé de l'azote et d'un composé du phosphore utilisables par les microorganismes, tandis que la phase externe est un liquide organique, non miscible à l'eau, de préférence
25 lipomiscible.

6.- Microémulsion suivant la revendication 5, dont la phase externe n'est pas utilisable, ou difficilement utilisable, par les microorganismes caractérisée en ce qu'une source hydrosoluble de carbone assimilable est ajoutée à la solution nutritive.

30 7.- Microémulsion suivant la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que le composé de l'azote est choisi parmi les substances capables de jouer le rôle d'un co-tensioactif pour la formation de la microémulsion.

8.- Microémulsion suivant une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce que le composé du phosphore est choisi parmi les tensioactifs
35 renfermant du phosphore dans leur molécule.

9.- Microémulsion suivant une des revendications 5 à 8, caractérisée en ce que le composé de l'azote est l'urée, celui du phosphore est un ester phosphorique tensioactif d'alkyle ou d'alkényle, le rapport pondéral P/N étant de 0,02 à 0,2, et, de préférence, 0,05 à 0,15.

5 10.- Microémulsion suivant une des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que le liquide non miscible à l'eau, formant la phase externe, est un acide gras, un ester d'acide gras ou un alcool gras, en particulier une huile végétale ou animale.

10 11.- Microémulsion suivant une des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que sa viscosité est abaissée par l'adjonction d'un diluant, de préférence un alcool, notamment en C₆ à C₁₂, d'un éther ou d'un ester de polyol, en particulier de glycol.

15 12.- Microémulsion suivant une des revendications 5 à 11, caractérisée en ce qu'elle contient des oligoéléments, en particulier des sels de Fe, Mg, K.

13.- Application de la microémulsion suivant une des revendications 5 à 12, aux opérations mettant en oeuvre la culture de microorganismes, caractérisée en ce que l'apport des substances nutritives au microorganismes est effectuée sous la forme de cette microémulsion.

20 14.- Application suivant la revendication 13, caractérisée en ce que l'opération consiste à dégrader des hydrocarbures recouvrant un plan d'eau ou de sol.

25

30

35