

**Titre:** Production sous conditions non stériles de biosurfactants synthétisés à partir de rejets industriels pour le lavage de sol contaminé  
**Title:**

**Auteur:** Muriel Gueissaz-Teufel  
**Author:**

**Date:** 1998

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Gueissaz-Teufel, M. (1998). Production sous conditions non stériles de biosurfactants synthétisés à partir de rejets industriels pour le lavage de sol contaminé [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
**Citation:** <https://publications.polymtl.ca/8539/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8539/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:** Réjean Samson, & Robert Legros  
**Advisors:**

**Programme:** Non spécifié  
**Program:**

## INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**UMI<sup>®</sup>**

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600



## **NOTE TO USERS**

**This reproduction is the best copy available.**

**UMI**





UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

PRODUCTION SOUS CONDITIONS NON STÉRILES DE BIOSURFACTANTS  
SYNTHÉTISÉS À PARTIR DE REJETS INDUSTRIELS POUR LE LAVAGE DE  
SOL CONTAMINÉ

MURIEL GUEISSAZ-TEUFEL  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
JUIN 1998

© Muriel Gueissaz-Teufel, 1998.



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-46651-5

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

PRODUCTION SOUS CONDITIONS NON STÉRILES DE BIOSURFACTANTS  
SYNTHÉTISÉS À PARTIR DE REJETS INDUSTRIELS POUR LE LAVAGE DE  
SOL CONTAMINÉ

Présenté par: GUEISSAZ-TEUFEL Muriel

en vue de l'obtention du diplôme de: Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. BUSCHMANN Michael D., Ph. D., président

M. SAMSON Réjean, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. LEGROS Robert, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. COMEAU Yves, Ph.D., membre

*Les bons succès dépendent quelquefois du défaut de jugement parce que le jugement empêche souvent d'entreprendre plusieurs choses que l'inconsidération fait réussir.*

*Madeleine de Souvré (1599-1678), maxime 24*

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier mon responsable de projet, Frédéric Shooner, qui fut un complice infatigable ; sa présence et sa franchise ont été pour moi sources de motivation. Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Réjean Samson, pour m'avoir communiqué son enthousiasme et m'avoir accordé toute sa confiance pour la réalisation de ce projet. Également, je remercie mon co-directeur, Robert Legros, pour ses conseils formateurs dont je n'ai pu pleinement profiter en raison de l'orientation que prenait le projet.

Je remercie mes collègues et amis avec qui les échanges ont toujours été enrichissants et agréables. Et tout particulièrement Yves, si prodigue de ses connaissances, dont j'ai beaucoup apprécié les conseils lors de l'écriture de la synthèse de ma recherche. Je n'oublie pas Gino, Marie-Claire, Manon, Yanick et Pierre qui m'ont apporté une aide technique précieuse.

Ma reconnaissance va également à messieurs Michel Lechasseur (*Sucres Lantic Ltée.*) et Alain Deblois (*Aliments Humpty Dumpty, Inc.*) qui ont bien voulu me procurer les rejets industriels nécessaires à la réalisation de ce projet de recherche.

Je remercie enfin les partenaires industriels de la chaire CRSNG sur les bioprocédés d'assainissement des sites, nommément *Premier Tech*, *Le centre québécois de valorisation de la biomasse*, *Pédro-Canada*, *Hydro-Québec*, *Les industries Browning-Ferris Ltée.*, *Le conseil de recherche en sciences naturelles et en génie*, *Cambior*, *SNC-Lavalin Environnement*, *Bodycote Analex Inc.*, *Bell Canada* et *La société d'électrolyse et de chimie Alcan*. Sans le support financier de ces entreprises la recherche n'aurait pu être accomplie.

## RÉSUMÉ

Lors de leur déversement dans l'environnement et de leur migration dans le sol, les hydrocarbures pétroliers d'un mélange se répartissent entre quatre phases : vapeur, aqueuse, liquide non aqueuse (libre) et particulaire (solide). De façon générale, plus la chaîne d'hydrocarbures du contaminant est longue, moins il sera accessible aux micro-organismes naturellement présents au niveau de la contamination. Cette notion d'accessibilité limite la portée des traitements biologiques en première ligne puisque les micro-organismes ne peuvent entrer en contact avec les contaminants pour les dégrader. Néanmoins, ceux-ci demeurent biodégradables : c'est leur non-biodisponibilité qui entrave la restauration biologique du sol.

Le lavage des sols contaminés aux composés hydrophobes difficilement accessibles aux micro-organismes est une technologie physico-chimique éprouvée pour leur restauration. Cette technologie, qui combine la séparation selon la granulométrie des particules et le retrait des contaminants à l'aide d'agents tensioactifs, présente toutefois quelques limitations. Celles-ci sont d'abord d'ordre environnemental, puisque les agents tensioactifs actuellement employés sont de nature synthétique et se montrent parfois toxiques et non biodégradables. Elles sont ensuite d'ordre économique, car leur utilisation peut représenter jusqu'à 50% du coût de traitement des sols. Ce dernier facteur limite grandement le recours au lavage de sol, où il y a traitement de la majeure partie du sol, face à l'enfouissement, où il n'y a que déplacement de la contamination.

Les travaux présentés dans ce mémoire se sont par conséquent penchés sur l'exploration d'une voie de traitement pour un sol contaminé aux hydrocarbures semi- et non-volatils, regroupés sous les  $C_{10}$ - $C_{50}$ . L'idée instigatrice trouve son origine dans la substitution des agents tensioactifs synthétiques (surfactants) par des biosurfactants. Ces derniers étant rarement disponibles à échelle industrielle ou à prix acceptable pour le lavage de sol, l'emphase fut mise sur l'étude d'une voie de production de biosurfactants permettant la valorisation de rejets industriels en vue d'en diminuer les coûts de production. Par ailleurs, en tenant compte que le procédé de lavage n'exige pas l'emploi de produits purs, le potentiel des bouillons bruts de productions de biosurfactants (i.e. non purifiés) fut étudié.

Une revue de la littérature a permis de sélectionner la levure *Candida bombicola* ATCC 22214 comme souche productrice de biosurfactants en raison de sa forte productivité, de son potentiel de production à partir de rejets industriels et de son pH de croissance, ce dernier permettant d'entrevoir un mode de production non stérile.

Les objectifs de la recherche ont ainsi porté sur deux aspects, soit la production de biosurfactants et le lavage de sol avec ces derniers. Conséquemment, il fallut démontrer la faisabilité de la production de biosurfactants par *Candida bombicola* ATCC 22214 en milieu non stérile, à partir de rejets industriels, et vérifier la faisabilité du lavage d'un sol contaminé aux  $C_{10}$ - $C_{50}$  à l'aide de milieux de production non purifiés de *Candida bombicola*.

La levure croît et synthétise les biosurfactants en présence de glucose et d'huile végétale. La substitution de ces deux substrats par de la mélasse non raffinée,



un sous-produit du raffinage du sucre, et de l'huile végétale usée, provenant de l'industrie des croustilles, fut évaluée en Erlenmeyer. Les résultats n'ont montré aucun effet significatif de l'huile végétale usée par rapport à de l'huile végétale pure sur la production de biosurfactants. En contrepartie, la substitution du glucose pur par de la mélasse a permis de maintenir un pH de production optimal (3,5) en raison du fort pouvoir tampon de celle-ci, ce qui favorise la production de biosurfactants. La production atteignit plus de 90 g/l en 13 jours pour les milieux contenant de la mélasse, par rapport à 70 g/l pour ceux en étant exempt et contenant du glucose.

Par la suite, les biosurfactants furent produits en réacteur de 80 litres, à partir de mélasse non raffinée et d'huile végétale usée, en milieu non stérilisé. La production obtenue dans ce cas fut de 70 g/l en dix jours, pour un rendement par rapport aux substrats allant jusqu'à 0,61 g/g. Le mélange de biosurfactants obtenu a montré les mêmes caractéristiques que celles publiées dans la littérature pour ce type de biosurfactants. Ainsi, la concentration micellaire critique fut mesurée à 25 mg/l et des chromatographies en couche mince ont permis de confirmer l'identité du mélange. Par ailleurs, la composition du mélange de production brut ne semblait pas affectée après deux mois d'entreposage à 4°C.

Les solutions de biosurfactants non purifiées, employées comme solution de lavage, ont permis de retirer 39 % des  $C_{10}$ - $C_{50}$  contenus dans un sable ( $\varnothing_{\text{particules}} < 1 \text{ mm}$ ) initialement contaminé à 13 400 mg/kg sec. La dilution des solutions jusqu'à une concentration de 40 % (v/v) en solution brute n'a pas diminué l'efficacité des lavages, qui furent réalisés en mode cuvée. Les sols lavés rencontraient les critères du Ministère de l'environnement et de la faune pour

une réutilisation dans un terrain à vocation commerciale ou industrielle (plage B-C). Cependant, l'huile végétale résiduelle provenant du milieu de production créait vraisemblablement des interférences dans les analyses de contaminants et celles-ci surestimaient la contamination réelle des sols lavés.

Les résultats de cette recherche démontrent la faisabilité d'une production de biosurfactants par *Candida bombicola* ATCC 22214 pouvant répondre aux exigences industrielles. La production fut démontrée en milieu non stérile, à partir de rejets industriels et à grande échelle. De plus, les contrôles associés à la production étaient à leur minimum, puisque aucune régularisation de température ou de pH externes n'étaient appliqués. Les solutions produites dans ces conditions peuvent être entreposées au moins deux mois sans en altérer l'efficacité. Telles que produites, ces solutions peuvent être diluées et restaurer un sable contaminé à 13 400 mg/kg C10-C50 jusqu'à 1 500 mg/kg. Les solutions de lavages sont biologiques et vraisemblablement biodégradables. Des essais supplémentaires sur le traitement des eaux de lavage et sur le polissage du sol lavé devraient être toutefois réalisés pour vérifier leur dégradation et la toxicité éventuelle des sous-produits de dégradation.

Enfin, la capacité de l'huile végétale seule à laver les sols fut évaluée. En effet, l'huile végétale est un composant organique possédant des propriétés lui permettant de jouer le rôle d'un solvant lourd. Les séries de lavage réalisées ont effectivement révélé un réel potentiel de l'huile végétale à extraire les contaminants hydrophobes peu solubles. Cette capacité devrait être évaluée pour d'autres contaminants (BPC, HAP, etc) et pour d'autres matrices.

## ABSTRACT

Once released in the environment, petroleum hydrocarbons migrate in the subsurface and partition between four phases : vapor, aqueous, non-aqueous liquid (free) and particulate (solid). Usually, the longer the hydrocarbon chain length, the less it will be accessible to the naturally occurring microorganisms present near the contamination. The unavailability of these compounds limits attempts to bioremediate polluted soils. The fact is, these pollutants remain biodegradable and it is their non-bioavailability that accounts for their persistence in the soil matrix.

Soil washing is a physico-chemical process involving particle size-separation and chemical desorption of the contaminants with help from surface active agents known as surfactants. The technology has been proven efficient for the removal of highly hydrophobic components from contaminated soils. Nevertheless, its application is hindered by the chemical nature of the surfactants used, which can be toxics and non degradables. Economics also play an important part, as surfactants are still expensive and can represent up to 50% of the total treatment cost. Consequently, landfill disposal is actually by far preferred, and therefore, the soils are not really treated.

The exploration of a soil washing process involving biosurfactants instead of their synthetic counterparts was the aim of the work presented here. The intricacy being the poor availability of biosurfactants at an industrial scale and their high associated cost, the emphasis of the research focused on the use of unexpensive raw substrates for the production of biosurfactants and the lowering of their cost. Furthermore, soil washing must not necessarily involve

pure products, so the potential of raw biosurfactant production broths was studied as washing solutions for a 13 400 mg/kg (dry) C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> contaminated sand (dia < 1mm).

A review of the existing literature lead to the choice of the yeast *Candida bombicola* ATCC 22214 as a biosurfactant-producing organism. Its high productivity, its potential of being produced from unexpensive raw substrates and its low pH growth were all factors leading to its selection. The latter having its importance for a non-sterile production process.

The research objectives followed two ways, one being biosurfactants production from *Candida bombicola* from industrial by-products under non-sterile conditions, the other being the use of these raw production broths for soil washing.

Glucose and vegetable oil are necessary for high biosurfactant production with the yeast *C. bombicola*. In the present research, these pure substrates were substituted without further purification with raw molasses, a by-product from sugar refinery, and used vegetable oil from food industry (chips processing).

The results showed that used vegetable oil instead of pure canola oil has little or no effect on the cultivation course of *Candida bombicola*. On the other side, the capacity of raw molasses to act as a buffer helped to maintain an optimum pH value (ca. 3.5) throughout the fermentations, compared to the cultivations in pure medium where pH dropped to values between 2.6 and 2.8. This factor probably contributed to better productivity in mediums containing raw

molasses instead of glucose, which were 90 g/l and 70 g/l in biosurfactants after 13 days of cultivation, respectively.

The same medium containing raw molasses and used vegetable oil was then used for a non sterile production of 80 liters in an agitated reactor. The biosurfactants production obtained after 10 days of cultivation was 70 g/l and yielded up to 0.61 g/g against the substrates consumed. The biosurfactants solution obtained showed the same characteristics as those published for pure cultivations. The critical micelle concentration was then measured at 25 mg/l and thin-layer chromatography performed on broth extracts were similar to those published for the components. The storage of raw production broth at 4°C for up to two months did not affect composition of the solution.

Raw production broths could remove 89% of C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> contained in the soil (dia.<1 mm) initially contaminated with 13 400 mg/kg C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. Use of wash solutions which were diluted down to a concentration of 40 % (v/v) in raw biosurfactant broth did not affect the removal efficiency of the soil washing process, which was conducted under batch conditions. Washed soil met the B-C restauration criteria (MEF) for its reuse in a commercial or industrial site. However, residual vegetable oil contained in the raw production broths used as wash solutions interfered with contaminants analysis, and most probably overestimated the real contamination level in the washed soil.

Results obtained in this research show the feasibility of a biosurfactant production process involving *Candida bombicola* ATCC 22214 which could meet industrial needs. Production under non sterile conditions from cheap industrials by-products was demonstrated to be comparable to those obtained

for pure processes, even at a larger scale. The process used was most simplified and did not involve any controls of temperature or pH, as they could self-regulate. Raw production solutions can be stored up to two months with no significant effect on their efficiency as washing solutions. As produced, diluted biosurfactants-containing solutions could lower the C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> soil contamination to 1,500 mg/kg (dry). Wash solutions are most probably biodegradable but toxicity tests should be made to verify possible treatment ways. Same tests should be made on biopile treatment of the washed soil for degradation of residual contaminants or vegetable oil.

Finally, the evaluation of vegetable oil alone as an extracting agent was studied. Properties of vegetable oil could make it act as a heavy solvent. Soil washing assays confirmed the great potential of vegetable oil used as an extracting agent. Up to 88 % of the C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> were removed for a 120 g/l aqueous solution of used vegetable oil which is most probably biodegradable, available at a low cost and does not involve a production process for the extracting agent. Further experiments on this ability of vegetable oil is recommended as it could be integrated in bioprocess or environmental engineering. Vegetable oil could act as an extracting agent for a number of hydrophobic compounds (PCBs, PAHs, etc).

## TABLE DES MATIÈRES

CITATION.....	IV
REMERCIEMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT .....	X
TABLE DES MATIÈRES .....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XVIII
LISTE DES TABLEAUX .....	XX
LISTE DES ANNEXES .....	XXI
LISTE DES SIGLES, NOTATIONS ET SYMBOLES.....	XXII
AVANT-PROPOS .....	XXIV
INTRODUCTION .....	I
CHAPITRE I.....	5
REVUE DE LITTÉRATURE .....	5
1.1. LES HYDROCARBURES PÉTROLIERS ET LES SOLS CONTAMINÉS .....	6
1.1.1. Structures et propriétés des hydrocarbures.....	8
1.1.2. Modèle de répartition des hydrocarbures .....	11
Volatilité.....	12
Adsorption.....	14
Porosité.....	16
1.2. LA TECHNOLOGIE DU LAVAGE DE SOL .....	19
1.2.1. Description de la technologie.....	20
1.2.1.1 Avantages .....	22
1.2.1.2 Limitations.....	23
1.2.1.3 Capacité de traitement et coût de la technologie.....	25

1.3. LES AGENTS TENSIOACTIFS .....	26
1.3.1. <i>Structure et propriétés</i> .....	26
1.3.1.1 Tension de surface : théorie .....	27
1.3.1.2 Formation de micelles .....	29
1.3.1.3 Concentration micellaire critique .....	30
1.3.1.4 Solubilisation .....	32
1.3.1.5 Émulsification .....	34
1.3.1.6 Caractéristiques des agents tensioactifs synthétiques .....	36
1.3.1.7 L'utilisation des agents tensioactifs pour la restauration des sols contaminés .....	37
Évaluation de la part du coût de traitement associé à l'achat de surfactants .....	39
1.3.2. <i>Les agents tensioactifs biologiques</i> .....	40
1.3.2.1 Caractéristiques .....	41
1.3.2.2 Structure et classification des biosurfactants .....	41
Biosurfactants vs bioémulsifiants .....	44
1.3.2.3 Biosynthèse .....	45
1.3.2.4 Production des biosurfactants .....	46
Production associée à la croissance .....	47
Production en phase de croissance, sous conditions limitantes .....	48
Production en phase stationnaire .....	48
Production avec ajout de précurseur .....	49
1.3.2.5 Récupération des biosurfactants .....	49
1.3.2.6 Positionnement des biosurfactants en environnement .....	51
1.3.3. <i>Candida bombicola ATCC 22214</i> .....	53
Structures des biosurfactants produits par <i>Candida bombicola</i> .....	54
Synthèse .....	56
Cinétique de production .....	59
Propriétés tensioactives .....	60
Application des sophorolipides .....	60
<b>CHAPITRE 2</b> .....	<b>62</b>
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	62
2.1. DÉMARCHE GÉNÉRALE .....	63
2.2. PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES (BIOSURFACTANTS) .....	64
2.2.1. <i>Sélection d'une souche productrice de biosurfactants</i> .....	64
2.2.2. <i>Provenance et maintien de la souche</i> .....	65
2.2.3. <i>Milieu de production (d'après Zhou et Kosaric, 1995)</i> .....	65
Température .....	66
pH .....	66



2.2.4. Conditions de production en Erlenmeyer .....	67
Inoculum .....	67
2.2.5. Conditions de production en réacteur .....	68
Inoculum .....	68
Réacteur .....	68
2.2.6. Techniques analytiques : suivi de la production .....	69
2.2.6.1 Biomasse (protocole P3C) .....	70
2.2.6.2 Sophorolipides .....	70
Gravimétrie (protocole P3C) .....	71
Spectrophotométrie (protocole P3E) .....	72
Chromatographie en couche mince (protocole P3F) .....	72
Mesure de la tension de surface et de la CMC (protocole P3G) .....	73
2.2.6.3 Huile végétale (protocole P3C) .....	73
2.2.6.4 Glucose (protocole P3D) .....	74
2.2.6.5 Rendement .....	74
2.2.6.6 Vérification de la pureté microbiologique du milieu non stérile (protocole P3H) .....	74
2.3. LAVAGE DE SOL .....	75
2.3.1. Sol à l'étude .....	75
2.3.1.1 Granulométrie .....	75
2.3.1.2 Contamination .....	75
2.3.2. Conditions de lavage (protocole P3I) .....	76
<b>CHAPITRE 3 .....</b>	<b>77</b>
PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES .....	77
– RÉSULTATS ET DISCUSSION - .....	77
3.1. PRODUCTIONS EN ERLENMEYER .....	78
3.1.1. Milieu idéal stérile .....	78
Techniques analytiques et erreur expérimentale .....	78
Suivi de la production .....	79
3.1.2. Milieu idéal non stérile .....	83
3.1.3. Production à partir de rejets industriels .....	86
3.1.3.1 Choix des rejets .....	86
Source hydrophile riche en hydrates de carbone .....	87
Source lipophile riche en acides gras polyinsaturés .....	90
3.1.3.2 Influence des rejets sur la production de sophorolipides .....	92
Chromatographie en couche mince .....	99
Conclusions des expériences en Erlenmeyer .....	102

3.2. PRODUCTION EN RÉACTEUR.....	104
3.2.1. <i>Production à partir d'un inoculum frais</i> .....	104
Conservation du bouillon de production.....	110
Chromatographie en couche mince .....	111
Tension de surface et concentration micellaire critique.....	114
3.2.2. <i>Production à partir d'un inoculum âgé</i> .....	115
Maintien d'une culture <i>Candida bombicola</i> en production.....	116
3.3. CONCLUSIONS SUR LA PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES.....	119
<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>121</b>
LAVAGES DE SOL CONTAMINÉ AUX HYDROCARBURES SEMI- ET NON-VOLATILS .....	121
-RÉSULTATS ET DISCUSSION-.....	121
4.1. LAVAGES DE SOL AVEC LES SOPHOROLIPIDES .....	122
4.1.1. <i>Essais préliminaires : solution de sophorolipides produite en milieu idéal stérile</i> .....	122
4.1.2. <i>Sophorolipides produits en réacteur</i> .....	123
4.1.2.1 Lavages à 50°C.....	123
4.1.2.2 Lavages à 21°C.....	127
4.2. INFLUENCE DE L'HUILE VÉGÉTALE SUR LES LAVAGES .....	130
4.3. CONCLUSIONS SUR LES LAVAGES.....	137
<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>138</b>
<b>LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>144</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b>	Structures de base des hydrocarbures.	8
<b>Figure 1.2</b>	Hydrocarbure hétérocycle	9
<b>Figure 1.3</b>	Modèle conceptuel de partition entre les phases d'un contaminant dans un.	11
<b>Figure 1.4</b>	Procédé de lavage de sol.	21
<b>Figure 1.5</b>	Molécule de surfactants	26
<b>Figure 1.6</b>	Représentation schématique illustrant le travail appliqué sur la surface d'un film:	28
<b>Figure 1.7</b>	Organisation des monomères	30
<b>Figure 1.8</b>	Concentration micellaire critique	31
<b>Figure 1.9</b>	Répartition des composés hydrophobes en présence de surfactants.	34
<b>Figure 1.10</b>	Structures de quelques glycolipides.	43
<b>Figure 1.11</b>	Cinétique de différents types de fermentation pour la production de biosurfactants.	47
<b>Figure 1.12</b>	Structure d'un sophorolipide de forme SL-1	55
<b>Figure 2.1</b>	Plan de travail	63
<b>Figure 2.2</b>	Réacteur pour la production de sophorolipides	69
<b>Figure 3.1</b>	Suivi de la production de sophorolipides par <i>Candida bombicola</i> en Erlenmeyer de 6 l dans un milieu stérilisé.	80
<b>Figure 3.2</b>	Suivi de la production en Erlenmeyer d'un litre à partir d'un milieu non stérilisé	83
<b>Figure 3.3</b>	Comparaison des productions de sophorolipides en milieu idéal stérilisé.	85
<b>Figure 3.4</b>	Évolution du pH lors de la production de sophorolipides en Erlenmeyer d'un litre	94
<b>Figure 3.5</b>	Évolution de la température du milieu pour des productions en Erlenmeyer d'un litre.	95
<b>Figure 3.6</b>	Production de biomasse en Erlenmeyer d'un litre	95
<b>Figure 3.7</b>	Consommation de glucose lors de productions en erlenmeryers d'un litre	96
<b>Figure 3.8</b>	Consommation d'huile végétale lors de productions en erlemeyers d'un litre.	97
<b>Figure 3.9</b>	Production de sophorolipides en Erlenmeyer d'un litre	98
<b>Figure 3.10</b>	Chromatographies en couche mince réalisées sur divers échantillons de milieu de production extraits à l'acétate d'éthyle.	101
<b>Figure 3.11</b>	Suivi de la production en réacteur de 100 litres.	105
<b>Figure 3.12</b>	Cinétiques de production en réacteur.	107
<b>Figure 3.13</b>	Comparaison des productions en Erlenmeyer et en réacteur.	108

<b>Figure 3.14</b>	Chromatographies en couche mince d'échantillons provenant d'une production en réacteur à partir d'un inoculum frais.	112
<b>Figure 3.15</b>	Concentration micellaire critique du mélange de sophorolipides purifiés produits par <i>Candida bombicola</i> à partir de mélasse et d'huile de canola usée dans un milieu non stérilisé.	114
<b>Figure 3.16</b>	Production en réacteur de 100 litres à partir d'un inoculum âgé de 10 jours	115
<b>Figure 4.1</b>	Lavages à 50°C d'un sol contaminé à 13 400mg/kg.	124
<b>Figure 4.2</b>	Lavages à 21°C d'un sol contaminé (13 400 mg/kg)	128
<b>Figure 4.3</b>	Lavages de sol avec de l'huile de canola usée.	131
<b>Figure 4.4</b>	Enlèvement par fraction d'hydrocarbures, en fonction de la concentration d'huile végétale dans la solution de lavage.	133
<b>Figure 4.5</b>	Enlèvement des C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> par des solutions à base d'huile de canola usée.	134
<b>Figure 4.6</b>	Comparaison entre les solutions de lavage.	135

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b>	Exemples d'hydrocarbures et leurs classes.....	9
<b>Tableau 1.2</b>	Composition des produits pétroliers.....	10
<b>Tableau 1.3</b>	Distribution des composés de l'essence dans le sous-sol à la suite d'un déversement.....	12
<b>Tableau 1.4</b>	Quelques hydrocarbures et leurs propriétés.....	16
<b>Tableau 1.5</b>	Porosité de différents types de sol.....	17
<b>Tableau 1.6</b>	Principaux surfactants synthétiques.....	37
<b>Tableau 1.7</b>	Source microbienne et tension de surface de quelques biosurfactants.....	44
<b>Tableau 2.1</b>	Contamination du sol, par plage d'hydrocarbures.....	76
<b>Tableau 3.1</b>	Composition moyenne de la mélasse non raffinée de <i>Sucre Lantic Ltée</i> .....	88
<b>Tableau 3.2</b>	Apport en azote de l'extrait de levure, de l'urée et de la mélasse non raffinée. ....	89
<b>Tableau 3.3</b>	Composition en acide gras de l'huile de canola pure. ....	91
<b>Tableau 3.4</b>	Influence de l'entreposage sur la solution de biosurfactants. ....	110
<b>Tableau 3.5</b>	Décomptes microbiens . ....	117
<b>Tableau 4.1</b>	Essais préliminaires de lavage sur un sable grossier. ....	122
<b>Tableau 4.2</b>	Composition de la solution brute de sophorolipides.....	123
<b>Tableau 4.3</b>	Concentrations en sophorolipides dans les solutions de lavage.....	124
<b>Tableau 4.4</b>	Détection des composés non polaires de l'huile de canola. ....	125

## LISTE DES ANNEXES

<b>ANNEXE A : PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX .....</b>	<b>156</b>
<b>ANNEXE B : GRANULOMÉTRIE DU SOL.....</b>	<b>212</b>

## LISTE DES SIGLES, NOTATIONS ET SYMBOLES

A	Aire
BPC	Biphényles polychlorés
C	Concentration
$C_{SURF}$	Concentration en surfactants
$C_{10-C50}$	Classe d'hydrocarbures pétroliers dont la chaîne carbonée possède entre 10 et 50 atomes
CCM	Chromatographie en couche mince
CMC	Concentration micellaire critique
$H_A(T)$	Constante de la loi de Henry du composé A dans l'eau, à la température du système
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
$K_M$	Coefficient de partition micelle-eau
$K_{ow}$	Coefficient de partition octanol-eau
MSR	Ratio molaire de solubilisation
NAPL	Phase liquide non aqueuse
o/w	Émulsion d'un composé hydrophobe dans une solution aqueuse ( <i>oil-in-water</i> )
P	Pression totale
$p_A$	Pression partielle du composé A dans la phase gazeuse
$p_A^*(T)$	Pression de vapeur du liquide A pur, à la température du système
q	Pourcentage d'enlèvement en contaminants dans le sol
$S_i$	Solubilité apparente du composé <i>i</i> dans la solution
$S_{i,CMC}$	Solubilité apparente du composé <i>i</i> à la concentration micellaire critique
SL	Sophorolipides

SVE	<i>Soil vapor extraction</i>
U.S.EPA	United States's Environmental Protection Agency
$W$	Travail (Nm)
w/o	Émulsion d'un composé hydrophile dans une phase hydrophobe ( <i>water-in-oil</i> )
$x_A$	Fraction molaire du composé A dans la phase liquide
$X_A$	Fraction molaire de composé dans la pseudo-phase aqueuse
$X_M$	Fraction molaire de composé dans la pseudo-phase micellaire
$Y$	Rendement (masse de sophorolipides produits/masse de substrats consommés)
$y_A$	Fraction molaire du composé A dans la phase gazeuse
$\sigma$	Tension de surface
$G_s$	Énergie libre de surface



## AVANT-PROPOS

Les sols contaminés restaurés jusqu'à la plage B-C des critères du ministère de l'environnement et de la faune peuvent être employés comme matériau de remblai dans un site d'enfouissement. Dans l'optique d'une chaîne de traitement globale opérant sur un tel site, un mode de traitement des sols contaminés employant les ressources disponibles sur un site d'enfouissement fut envisagé. C'est pourquoi les efforts de cette recherche ont d'abord porté sur le lixiviat de site d'enfouissement, qui fut initialement identifié comme rejet industriel cible pour la production de biosurfactants destinés au lavage de sols contaminés.

Les expériences visaient à stimuler la synthèse de biosurfactants par les micro-organismes indigènes du lixiviat, en contrôlant certains besoins nutritionnels et conditions de productions documentées pour les biosurfactants en général. Bien que présentant initialement des propriétés tensioactives, le lixiviat de site d'enfouissement ne semblait cependant pas contenir les micro-organismes producteurs de biosurfactants. C'est à la suite de ces résultats que le choix d'un micro-organisme producteur s'est imposé, ce qui impliquait également la mise de côté du lixiviat de site d'enfouissement comme milieu de production à cette étape. Ce choix de micro-organisme fut cependant réalisé dans l'optique d'une production à partir de rejets industriels.

Par conséquent, les résultats générés à partir de lixiviat de site d'enfouissement ne font pas l'objet de ce rapport, car les travaux ont rapidement été dirigés sur la production de biosurfactants à partir d'un inoculum pur.

## INTRODUCTION

Les hydrocarbures pétroliers forment une classe de produits d'usage mondialement répandu et d'applications multiples. Les composés d'hydrocarbures sont nombreux et communément classés en fonction du nombre d'atomes de carbones contenus dans leur chaîne. Ainsi, les hydrocarbures pétroliers totaux sont représentés sous les C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. Parmi ceux-ci se situe toute une gamme de composés se répartissant entre volatils (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>), semi-volatils (C<sub>11</sub>-C<sub>18</sub>) et non-volatils (C<sub>18</sub> et +) (U.S.EPA, 1991).

Lors d'un déversement dans l'environnement, il y a répartition de ces composés au sein de quatre phases, soit une phase vapeur où se dirigent les volatils, une phase libre où se retrouvent les composés peu solubles, une phase aqueuse où certains composés sont solubilisés, et enfin une phase solide où les composés les plus lourds et les plus hydrophobes sont adsorbés (Cookson, 1995).

Parmi les traitements préconisés pour la restauration des sols (phase solide) se situent les procédés de mise en décharge, d'encapsulation/stabilisation et d'incinération (U.S.EPA, 1997). Mais les coûts reliés à l'incinération et la réticence grandissante du public face à cette option y limitent le recours (Davis *et al.*, 1995). D'autre part, les procédés de stabilisation et de mise en décharge ne peuvent être retenus comme solutions à long terme puisqu'ils ne constituent pas des voies de traitement. Il faut par conséquent viser l'application de technologies alternatives pour la restauration de sols contaminés. Celles-ci comprennent entre autres l'extraction par solvant, l'extraction sous vide, la désorption thermique, le lavage de sol, la vitrification, et la biorestauration.

Elles n'occupaient toujours en 1995 qu'environ 40% du marché américain, ce pourcentage demeurant relativement stable depuis 1992 (U.S.EPA, 1991 ; U.S.EPA, 1997).

Le traitement par biorestauration de sols contaminés par des hydrocarbures de haut poids moléculaire ( $C_{30}$ - $C_{50}$ ) comme les huiles de lubrification demeure laborieux en raison des propriétés physiques des polluants. Mais il est essentiel de retenir que s'ils sont difficilement biodégradés, ces composés demeurent tout de même biodégradables et que c'est la non disponibilité des polluants organiques aux micro-organismes dégradeurs qui limite la portée des traitements biologiques (Alexander, 1994 ; Zhang et Miller, 1992) en tête de procédé.

Le mariage des bioprocédés et des technologies physico-chimiques peut dans ce cas être avantageux. Il s'agit d'intégrer les procédés biologiques aux procédés physico-chimiques : le concept de chaîne de traitement prend toute son importance et est particulièrement approprié dans les cas de contamination complexe aux hydrocarbures récalcitrants (Samson, 1994). Néanmoins, le problème typique de génération de sous-produits de traitements, comme des acides et des solutions de lavage toxiques, par les procédés physico-chimiques demeure, de même que leurs coûts élevés d'application.

La récalcitrance de certains composés pétroliers à la biodégradation résulte de leur forte adsorption sur les particules de sol. La technologie du lavage de sol (*ex situ*) avec agents tensioactifs est une voie de traitement innovatrice précisément conçue pour remédier à cette problématique (U.S.EPA, 1991 ; Freeman et Harris, 1995). Mais les agents tensioactifs (aussi appelés surfactants)

présentement employés à cette fin sont de nature synthétique, souvent toxiques et non biodégradables, générant par conséquent une solution de lavage riche en contaminant(s) et surfactants en cours de traitement (Sims, 1990). De plus, si les surfactants sont efficaces pour le lavage des sols (Ang et Abdul, 1991), leur usage est fortement limité par leur coût excessif qui peut s'élever jusqu'à 50% du coût total d'un procédé (Zhou et Kosaric, 1995).

La substitution des surfactants synthétiques par des surfactants biologiques, des biosurfactants, se présente comme l'intégration idéale d'une composante biologique au procédé physico-chimique de lavage. Cependant, ceux-ci n'étant disponibles ni en quantités industrielles ni à des prix concurrents, il faut, pour satisfaire aux exigences industrielles, étudier une voie de production de biosurfactants qui soit économiquement acceptable à des fins de lavage de sol.

L'utilisation de produits purs n'est pas primordiale dans le procédé de lavage de sol : cet énoncé est à la base des simplifications et modifications étudiées dans la présente recherche. Ainsi, l'utilisation de biosurfactants non purifiés et de milieux de production non stériles pourrait satisfaire aux besoins du procédé de lavage de sol. Plus encore, l'usage de rejets industriels comme base de production des biosurfactants permettrait de diminuer les coûts reliés aux substrats utilisés pour leur biosynthèse tout en favorisant la valorisation de ces résidus.

*Dans cette lignée, le présent projet explore une voie de traitement pour un sol contaminé aux hydrocarbures lourds où l'emphase est mise sur la valorisation de rejets industriels dans un procédé de lavage de sol. L'idée instigatrice repose sur la substitution des surfactants synthétiques*

*actuellement employés pour le lavage de sol par des surfactants biologiques. Deux aspects sont donc considérés, à savoir la production de la solution de lavage et le lavage proprement dit.*

### Hypothèse de recherche

L'hypothèse sur laquelle se base la recherche s'énonce comme suit :

- *Des solutions de production de biosurfactants non purifiées, lesquelles sont produites par *Candida bombicola* ATCC 22214 en milieu non stériles à partir de rejets industriels, peuvent laver un sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers peu ou non-volatils, regroupés sous les C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.*

### Objectifs

Les travaux se scindent en deux volets, soit la production de biosurfactants et le lavage des sols, et les objectifs correspondants sont les suivants :

- *Démontrer la faisabilité de la production de biosurfactants par *Candida bombicola* ATCC 22214 en milieu non stérile, à partir de rejets industriels ;*
- *Vérifier la faisabilité du lavage d'un sol contaminé aux C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> à l'aide de milieux de production non purifiés de *Candida bombicola*.*

# CHAPITRE 1

## REVUE DE LITTÉRATURE

*Le chapitre 1 présente les éléments pertinents pour cerner le cadre de la recherche, préciser le domaine d'application et fournir les informations nécessaires à la compréhension du contexte du projet et de son évolution. Ces informations ont été puisées dans les revues scientifiques, livres techniques et rapports publics. En premier lieu, un approfondissement de la problématique des hydrocarbures pétroliers et des sols contaminés est présenté, suivi d'un exposé sur la technologie du lavage de sol. Ensuite, une importante section se consacre aux agents tensioactifs chimiques et biologiques, à leurs propriétés et caractéristiques.*

### 1.1. LES HYDROCARBURES PÉTROLIERS ET LES SOLS CONTAMINÉS

---

La deuxième révolution industrielle de 1880 répandit l'usage de nouvelles énergies dont les produits pétroliers englobaient une large part et demeurent aujourd'hui la principale source (Willerval *et al.*, 1988). Comme pour la plupart des produits chimiques à cette époque, leur développement et leur utilisation précédaient la connaissance complète de leurs impacts sur l'environnement et la santé humaine.

À la suite de certaines étapes de raffinage, les hydrocarbures pétroliers sont acheminés vers des points de distribution et des industries diverses. Ces composés y sont employés comme carburants, solvants et produits primaires dans les industries du textile, pharmaceutique et plastique; ils représentent une des fractions les plus usées de produits chimiques dans le monde industrialisé (Reisinger, 1995). De pair avec cet usage généralisé naissent de nombreux sites contaminés, dont plusieurs seront plus tard orphelins.

Ce n'est qu'à partir des années 60 que la sensibilisation face aux conséquences environnementales des usages des produits chimiques fut amorcée, notamment avec la mise au jour des effets néfastes du DDT (U.S.EPA, 1995). C'est ainsi que le ministère de l'Énergie et des Ressources (MER) n'adopta qu'en 1991 le Règlement sur les produits pétroliers qui exige pour l'an 2001 le remplacement de tous les réservoirs souterrains en acier non protégé contre la corrosion et utilisés pour l'entreposage de carburant, lubrifiant ou de mazout (Table de concertation sur les lieux contaminés, 1993). L'introduction de ce règlement

reconnaît la présence de la contamination des sols au voisinage de ces réservoirs et la nécessité d'y remédier. Il fut estimé qu'en regard de ce règlement spécifique, il y avait au Québec en 1993 plus d'un million de mètres cubes de sols contaminés aux hydrocarbures (Table de concertation sur les lieux contaminés, 1993). Mais nombre d'autres contaminations prennent leur origine de déversements accidentels (contamination ponctuelle) ou fonctionnels (contamination constante) qui sont reliés à l'utilisation et manipulations courantes des hydrocarbures. Par exemple, les raffineries, les zones aéroportuaires et les lieux d'entretien de véhicules ne sont que quelques-unes des autres sources ayant contribué à la création de sites contaminés aux hydrocarbures (Cookson, 1995 ; Reisinger, 1995 ; U.S.EPA, 1997). De plus, comme ces terrains se situent fréquemment en zone industrielle et qu'ils offrent un fort potentiel de développement, le marché actuel de l'achat et de la revente de terrains est un facteur supplémentaire pour une décontamination active des terrains.

Par leur importance, les terrains contaminés aux hydrocarbures pétroliers sont d'un intérêt particulier pour la mise au point de procédés de restauration. Ceux-ci, après avoir porté sur les composés les plus manifestes comme les composés volatils, visent de plus en plus leurs composés les plus difficiles à retirer ou éliminer du sol (Reisinger, 1995 ; U.S.EPA, 1997). Cette résistance s'explique par leur migration et leur répartition dans le milieu après un déversement.

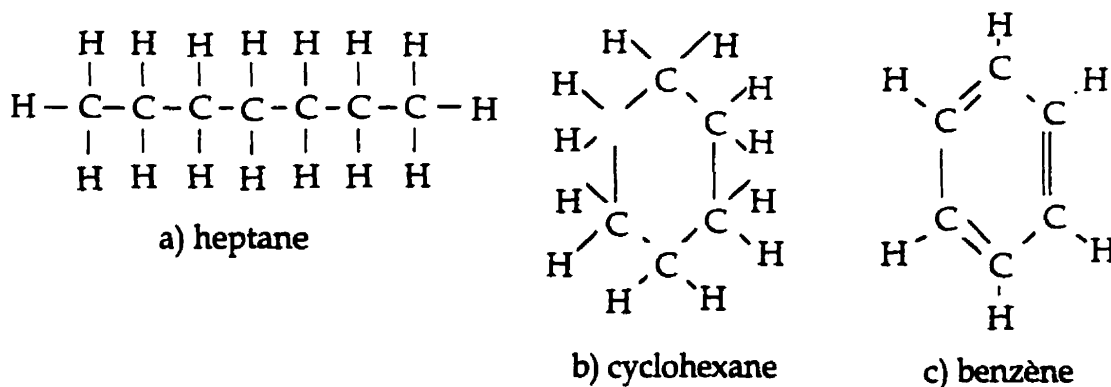
Le degré de contamination et les actions à entreprendre pour restaurer le site sont définis au Québec à partir de certains critères incluant la sensibilité de



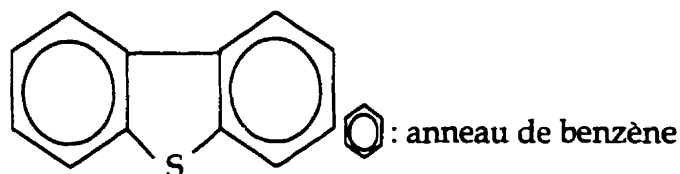
l'usage du terrain, la concentration du ou des contaminants, leur nature et, plus récemment, leur toxicité (MEF, 1996).

### 1.1.1. STRUCTURES ET PROPRIÉTÉS DES HYDROCARBURES

Les hydrocarbures forment une classe de nombreux composés aux caractéristiques différentes. La plupart des mélanges d'hydrocarbures sont constitués de composés aliphatiques, alicycliques, aromatiques et aromatiques hétérocycles (Cookson, 1995). Les hydrocarbures aliphatiques sont caractérisés par une chaîne linéaire d'atomes de carbone qui peut contenir des liaisons doubles ou triples ainsi que des ramifications. Les alicycliques sont caractérisés par un anneau carboné dans leur structure, tandis que les aromatiques présentent un anneau de benzène qui se reconnaît par des liens doubles en alternance entre chaque atome de carbone. La figure 1.1 illustre les structures de base. Enfin, les composés hétérocycles sont des composés aromatiques dont un atome est un atome de soufre, d'azote ou d'oxygène (figure 1.2).



**Figure 1.1** Structures de base des hydrocarbures. a) composé aliphatique. b) composé alicyclique. c) composé aromatique.



**Figure 1.2** Hydrocarbure hétérocycle (dibenzothiophène).

À titre d'exemples, on retrouve typiquement dans le diésel (*fuel oil* n°2) environs 30% d'alcanes (aliphatiques), 45% de cycloalcanes (alicycliques) et 25% d'aromatiques. L'huile brute (*crude oil*) quant à elle peut contenir jusqu'à 22% d'hétérocycles (Cookson, 1995). D'autres composés couramment retrouvés dans les mélanges d'hydrocarbures sont mentionnés au tableau 1.1 en fonction de leur classe. Par ailleurs, il est également fréquent de regrouper les hydrocarbures sous le nom du produit commercial où on les retrouve (tableau 1.2).

**Tableau 1.1** Exemples d'hydrocarbures et leurs classes

Classe	Composés
Aliphatiques	3,3,4-triméthylhexane, 1-pentène
Alicycliques	cyclopentane, cyclohexane
Aromatiques	naphtalène, BTEX <sup>1</sup>
Hétérocycles	carbazole

SOURCE: (Cookson, 1995).

<sup>1</sup>Benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes (*ortho*-, *méta*- et *para*-).

**Tableau 1.2** Composition des produits pétroliers.

<i>Produit commercial</i>	<i>Composants majoritaires</i>	<i>Nombre de carbones</i>	<i>Volatilité</i>
Gaz	Alcanes ramifiés/ non ramifiés.	1 - 5	Volatils
Essence ( <i>gasoline</i> )	Cycloalcanes et alkylbenzènes ramifiés/ non ramifiés.	6 - 10	Volatils
Pétrole lampant ou kérosène/ diésel n°1	Alcanes , cycloalcanes, aromatiques (dont quelques polyaromatiques), ramifiés/ non ramifiés.	11 - 12	Semi-volatils
Huiles légères, gazole	Alcanes, cycloalcanes, aromatiques et cycloalcanes aromatiques. Oléfines. ramifiés/ non ramifiés.	12 - 18	Semi-volatils
Huiles lourdes et huiles lubrifiantes légères.	Hydrocarbures lourds.	18 - 25	Non-volatils
Lubrifiants	Composés polycycliques lourds	26 - 38	Non-volatils
Mazout Asphalte ou brais		38 +	Non-volatils

SOURCE: (Hart et Conia, 1987).

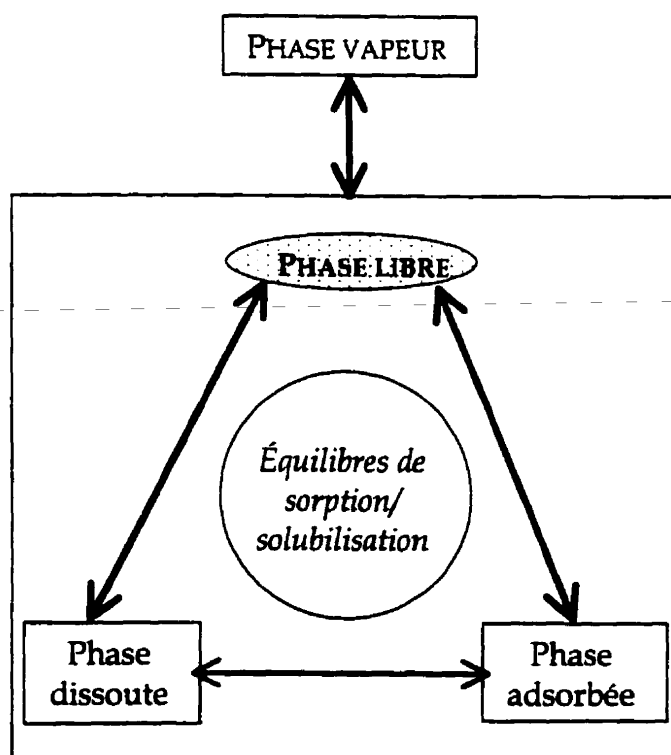
Le tableau 1.2 indique la tendance des produits pétroliers commerciaux à se volatiliser ; cette propriété est d'importance pour l'évaluation de la contamination, sa répartition et le choix d'une technique de traitement, qui sont abordés à la section suivante.

### 1.1.2. MODÈLE DE RÉPARTITION DES HYDROCARBURES

Lors d'un déversement, les hydrocarbures d'un mélange se répartissent selon quatre phases au cours de leur migration dans le sol (Cookson, 1995 ; Reisinger, 1995 ; Mihelcic, 1995) :

1. Une phase vapeur;
2. Une phase adsorbée (associée à la phase solide);
3. Une phase libre;
4. Une phase dissoute.

Le modèle conceptuel de la migration des hydrocarbures dans le sol et les eaux souterraines est illustré à la figure 1.3.



**Figure 1.3** Modèle conceptuel de partition entre les phases d'un contaminant dans un sol (adapté de Reisinger, 1995).

Le tableau 1.3 donne la distribution typique des composés de l'essence dans les phases du sous-sol à la suite d'un déversement. On y remarque que la majeure partie des contaminants se retrouve dans la phase adsorbée.

**Tableau 1.3** Distribution des composés de l'essence dans le sous-sol à la suite d'un déversement.

<i>Phase</i>	<i>Volume (litres)</i>
Vapeur	25
Libre	variable
Asorbée	962
Dissoute (eaux souterraines)	13
Total	1000
	(en plus de la phase libre)

SOURCE : (Cookson, 1995).

Les interactions entre les hydrocarbures et la matrice qui les recueille sont fonction des caractéristiques physico-chimiques de chacun et peuvent être représentées par des relations mathématiques. Par exemple, la proportion d'un contaminant qui s'est évaporé peut être estimée par la loi des gaz parfaits, l'atmosphère de la zone vadose étant, comme l'atmosphère extérieure, principalement constituée d'azote et d'oxygène (Mackay et Paterson, 1981).

### **Volatilité**

La tendance d'un composé à se volatiliser d'une solution liquide est exprimée par la loi de Henry (eq. 1.1) qui relie la composition à l'équilibre d'un liquide à une constante (Felder et Rousseau, 1986). À partir de cette équation, on remarque que la constante de Henry est inversement proportionnelle à la solubilité du composé dans le liquide.

On peut également évaluer la volatilité par le biais de la pression de vapeur du composé au-dessus de sa phase libre. Comme la phase libre est un mélange d'hydrocarbures, des substances similaires, la pression de vapeur d'un contaminant donné du mélange peut être reliée à sa composition. Cette relation est représentée par la loi de Raoult (éq.1.2) (Felder et Rousseau, 1986). Plus la pression de vapeur est élevée, plus le contaminant aura tendance à se volatiliser.

*Loi de Henry\**:

$$p_A \equiv y_A P = x_A H_A (T) \quad (\text{éq.1.1})$$

Où:

$p_A$ : Pression partielle de l'hydrocarbure A dans la phase gazeuse (zone vadose);

$y_A$ : Fraction molaire de l'hydrocarbure A dans la phase gazeuse;

$P$ : Pression totale;

$x_A$  : Fraction molaire de l'hydrocarbure A dans la phase liquide;

$H_A (T)$  : Constante de la loi de Henry du composé A dans l'eau, à la température du système.

\* La loi de Henry est généralement applicable aux solutions diluées en A (contaminant), ce qu'on observe lorsqu'il est question de contamination.

*Loi de Raoult:*

$$p_A \equiv y_A P = x_A p_A^*(T) \quad (\text{éq.1.2})$$

$p_A^*(T)$ : Pression de vapeur du composé liquide A pur, à la température du système.

Suivant ce qui précède, plus la constante de Henry est élevée, plus le composé aura tendance à se volatiliser. Ainsi dans la zone vadose qui est non saturée en eau, les composés très volatils vont tendre à se disperser dans l'atmosphère de cette zone et pourront être traités par extraction sous vide. Les hydrocarbures de moins de 10 atomes de carbone, dont les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, *o*-xylène, *m*-xylène et *p*-xylène) font partie, sont effectivement de plus en plus couramment extraits par cette voie. Celle-ci est souvent identifiée dans la littérature par le terme SVE pour *soil-vapor extraction* (U.S.EPA, 1997).

### Adsorption

On entend par adsorption la rétention d'un soluté en solution par la surface d'un matériau solide, alors que l'absorption réfère à la rétention du soluté à l'intérieur de la masse du solide (Alexander, 1994).

Lors d'un déversement, les hydrocarbures migrent, de pair avec l'eau souterraine, dans les pores du sol, ce qui l'entraîne éventuellement dans l'aquifère. Au cours de cette migration, certains composés de faible solubilité vont se répartir sur d'autres phases non-polaires comme le sol, les sédiments et d'autres matériaux organiques tels les acides humiques (Alexander, 1994 ; Bai *et al.*, 1997 ; Cookson, 1995 ; Thangamani et Shreve, 1994). La force de cette adsorption dépend du contaminant et de la matrice sur lequel il est adsorbé.

En général, la tendance d'un composé à s'adsorber sur un matériau est évaluée par le coefficient de partition octanol/eau (Cookson, 1995 ; Raghavan *et al.*, 1990 ; U.S.EPA, 1997), un coefficient indépendant de la matrice d'adsorption mais inversement proportionnel à la solubilité aqueuse du composé et directement proportionnel à son poids moléculaire (U.S.EPA, 1991). Il représente la

proportion du composé qui se retrouve dans la partie organique d'un mélange égal d'octanol et d'eau. Plus le composé sera soluble dans la phase organique (octanol), plus il aura tendance à s'adsorber sur les particules de sol ou de matière organique.

Plusieurs valeurs de coefficients, normalement identifié sous le  $\log K_{ow}$  d'un composé, sont compilées pour divers contaminants et disponibles dans la littérature. Ainsi, un  $\log K_{ow}$  supérieur à 3,5 indique une tendance élevée à l'adsorption (U.S.EPA, 1991) : le composé est plus de 3500 fois plus soluble dans la partie organique que dans la partie aqueuse. L'étendue de la rétention des contaminants est directement corrélée avec la valeur du coefficient de partition octanol-eau et le pourcentage de carbone organique dans le sol (Alexander, 1994). En effet, la matière organique présente dans le sol exerce une forte attraction sur les composés hydrophobes. Pour ces raisons, la présence d'argile et de matière organique dans un sol influencera l'efficacité des traitements d'extraction (Alexander, 1994 ; Freeman et Harris, 1995 ; Raghavan *et al.*, 1990).

À titre d'exemples, le chloroforme, un solvant très volatil, possède un coefficient de partition faible ( $\log K_{ow} = 1,97$ ), les BTEX ont des coefficients de partition modérés ( $2,5 \leq \log K_{ow} \leq 3,5$ ), tandis que celui de l'anthracène, un hydrocarbures aromatique polycyclique, est élevé ( $\log K_{ow} = 4,45$ ) (U.S.EPA, 1991). Le tableau 1.4 présente quelques exemples d'hydrocarbures et leurs propriétés.

L'adsorption est d'autant plus forte que la surface spécifique des particules est grande. Plusieurs études ont montré que le niveau de contamination décroît avec la taille des particules (Park et Jaffé, 1995 ; U.S.EPA, 1991 ; U.S.EPA, 1998).



Par conséquent, l'adsorption est importante sur les particules d'argile, qui ont une grande surface spécifique (environ 1000 m<sup>2</sup>/g d'argile).

**Tableau 1.4** Quelques hydrocarbures et leurs propriétés

<i>Hydrocarbure</i>	<i>Formule moléculaire</i>	<i>Solubilité aqueuse (mg/l)</i>	<i>log K<sub>ow</sub><sup>6</sup></i>
<i>n</i> -décane <sup>1</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	51 x 10 <sup>-3</sup>	5,62
<i>n</i> -dodécane <sup>1</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	36 x 10 <sup>-4</sup>	6,51
<i>n</i> -hexane <sup>1</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	12	4,11
cyclohexane <sup>2</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	55	3,44
benzène <sup>3</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	17 x 10 <sup>2</sup>	2,13
toluène <sup>3</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	50 x 10 <sup>1</sup>	2,69
<i>o</i> -xylène <sup>3</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	17 x 10 <sup>1</sup>	3,12
naphtalène <sup>4</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	32	3,36
phénanthrène <sup>4</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	13 x 10 <sup>-1</sup>	4,57
pyrène <sup>4</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	14 x 10 <sup>-2</sup>	5,18

<sup>1</sup> *n*-alcane, sites contaminés aux liquides légers non aqueux (LNAPL), comme l'essence, le kérosène et le carburant d'avion à réaction (*jet fuel*).

<sup>2</sup> cycloalcane

<sup>3</sup> aromatiques volatils (BTX) ou aromatiques monocycliques (HAM)

<sup>4</sup> aromatiques polycycliques (HAP) représentatifs des liquides denses non aqueux (DNAPL)

<sup>6</sup> log K<sub>ow</sub> < 2,5 : faible ; 2,5 ≤ log K<sub>ow</sub> ≤ 3,5 : modéré ; log K<sub>ow</sub> > 3,5 : élevé (U.S.EPA, 1991)

SOURCES : (Diallo *et al.*, 1994 ; Edwards *et al.*, 1991).

## Porosité

La porosité est une des plus importantes caractéristiques propre au sol influençant les interactions avec les contaminants (Cookson, 1995). Elle est définie par le volume des vides sur le volume total d'un élément de volume de sol. Elle s'exprime en pourcentage et dépend principalement de la distribution des particules et de la structure du sol. Le tableau 1.5 présente les valeurs typiques de porosité pour différentes classes granulométriques.

**Tableau 1.5** Porosité de différents types de sol

<i>Sol</i>	<i>Porosité (%)</i>
Gravier grossier	24-36
Gravier fin	25-38
Sable grossier	31-46
Sable fin	26-53
Limon	34-61
Argile	34-60

SOURCE : (Cookson, 1995).

En principe, plus la porosité est élevée, plus le sol pourra contenir une part importante de contaminants. En règle générale, les contaminants difficiles à déloger se retrouvent en surface et à l'intérieur des pores du sol (Ang et Abdul, 1991). La pluie tombant sur le sol peut servir d'exemple pour expliquer les forces capillaires causées par la présence des pores. L'eau qui s'infiltré dans le sol remplit les pores en déplaçant l'air et sature éventuellement le sol. À l'arrêt de la pluie, l'humidité du sol diminue en raison de la gravité. Mais en raison de la tension de surface de l'eau, une quantité d'eau demeure adhérente au sol. Pour retirer cette eau, il faut appliquer une pression supérieure à celle exercée par la gravité. La succion nécessaire représente le potentiel matriciel du sol. Plus les pores du sol sont petites, plus les forces capillaires et le potentiel matriciel seront élevés (Cookson, 1995). Ainsi, les forces capillaires sont les principales forces retenant les composés hydrophobes dans le sol (West et Harwell, 1992).

Les pores peuvent être qualifiées de macropores (diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$ ) ou de micropores (diamètre inférieur à 100  $\mu\text{m}$ ). Ce facteur est déterminant en biorestauration, puisqu'on considère que les bactéries migrent peu dans les micropores, trop étroites (Vandermark et Batzing, 1987). Il fut cependant prouvé que la restauration de systèmes hydrogéologiques poreux contaminés

par des huiles peuvent être améliorée à l'aide de surfactants (Ang et Abdul, 1991). Ceux-ci, en diminuant la tension de surface de l'eau, augmentent l'habileté des forces visqueuses à contrer les forces capillaires qui retiennent les contaminants dans les pores, ce qui facilite leur déplacement (Ang et Abdul, 1991). Les hydrocarbures semi-volatils et non-volatils peu solubles ( $\geq C_{11}$ ) qui se présentent sous forme liquide non-aqueuse (*non-aqueous phase liquid*, NAPL), font généralement partie des contaminants devant être délogés des particules de sol par extraction pour que celui-ci soit restauré.

---

## 1.2. LA TECHNOLOGIE DU LAVAGE DE SOL

---

Les propriétaires et promoteurs de terrains contaminés démontrent en général de l'intérêt pour un traitement de restauration rapide du terrain. En effet, la dynamique d'achat et de revente de terrains incite les promoteurs à les décontaminer avant la revente, puisque les institutions financières n'accordent plus de prêts aux acheteurs de terrains contaminés, en cas de non-solvabilité de ces derniers (Meunier, 1994 ; Samson, 1994). Dans ce contexte, la technologie doit permettre une restauration rapide et permanente des sols.

Bien que le recours à la technologie du lavage de sol soit marginal au Québec et aux États-Unis, plusieurs rapports de l'Agence de protection environnementale des États-Unis (U.S.EPA) et études scientifiques démontrent son efficacité pour le traitement de sols contaminés aux composés organiques hydrophobes, aux métaux et aux matériaux radioactifs (Freeman et Harris, 1995 ; Misra et Mehta, 1995 ; Raghavan *et al.*, 1990 ; U.S.EPA, 1991; U.S.EPA, 1997 ; U.S.EPA, 1998). Elle est par ailleurs beaucoup plus largement employée en Allemagne où l'on traite majoritairement des sols contaminés aux huiles minérales (Glass *et al.*, 1995). La popularité en Allemagne et en Europe pour cette technologie est encouragée par une forte tendance vers des centres de traitement centralisés, permettant la restauration de dizaines de milliers de tonnes de sol par année (Glass *et al.*, 1995).

### 1.2.1. DESCRIPTION DE LA TECHNOLOGIE

La technologie du lavage de sol est un procédé de réduction de volume et de lavage mécanique à base d'eau qui utilise des unités physiques pour concentrer et retirer les contaminants. Les contaminants sont retirés du sol selon l'une et/ou l'autre des voies suivantes (Raghavan *et al.*, 1990 ; U.S.EPA, 1997 ; U.S.EPA, 1998) :

- Par concentration des contaminants dans un volume réduit (10% à 30% du volume initial, (U.S.EPA, 1992)) de sol à la suite d'une séparation des particules;
- Par solubilisation des contaminants dans la solution de lavage.

Les premières étapes du procédé visent à défaire les agrégats de sol en particules simples de gravier (fraction grossière,  $\varnothing_{\text{particules}} > 4,75 \text{ mm}^1$ ), sable (fraction sablonneuse,  $0,075 \text{ mm} < \varnothing_{\text{particules}} < 4,75 \text{ mm}^1$ ), limon et argile (fraction fine,  $\varnothing_{\text{particules}} < 0,075 \text{ mm}^1$ ). Un frottement intense et abrasif entre les particules libère les fines et le sable contaminés collés en surface des fractions plus grossières. Ensuite, ces particules sont ségréguées par le biais de tambour rotatif, d'eau à haute pression et de séparateurs hydrogravimétriques (hydrocyclones, vis sans fin, unité de flottation, etc.). Un exemple de procédé de lavage de sol est présenté à la figure 1.4. Au cours de ces étapes et selon la contamination, des agents d'extraction chimiques (acides, bases, agents chélatants et surfactants) peuvent être introduits pour faciliter l'enlèvement et la dispersion des contaminants de la surface des particules (Raghavan *et al.*, 1990 ; U.S.EPA, 1998).

---

<sup>1</sup> Selon la classification de l'American Society for Testing & Materials (ASTM, D-2487, 1985) (Gee et Bauder, 1986).

Pour faciliter l'enlèvement des composés organiques, un surfactant est normalement ajouté à l'eau de lavage, tandis que les autres produits chimiques comme les agents chélatants et les acides visent à enlever les métaux lourds et les matériaux radioactifs.

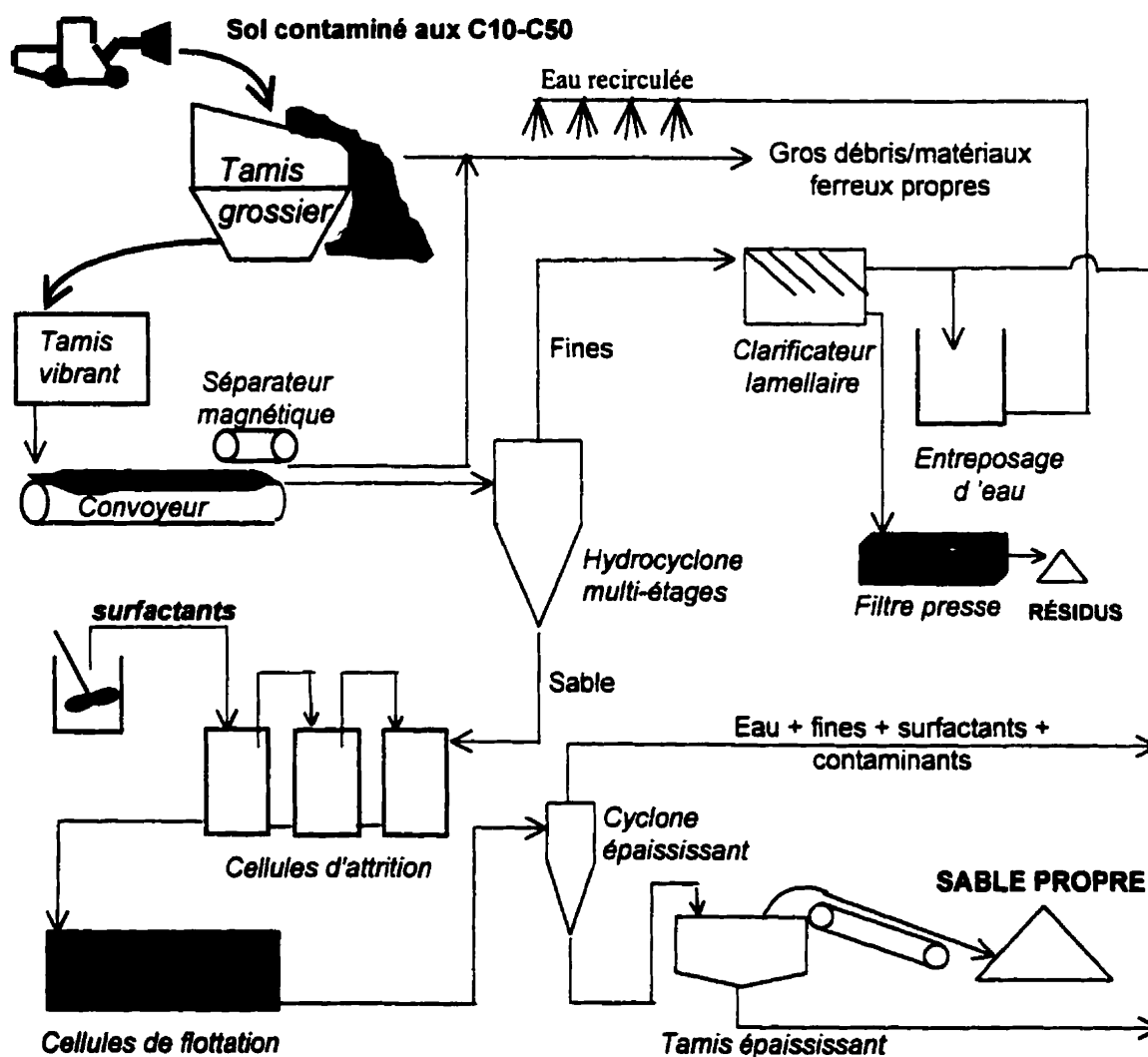


Figure 1.4 Procédé de lavage de sol.

L'ajout de surfactants se fait généralement dans les cellules d'attrition qui traitent les fractions fine et sablonneuse du sol. Une agitation vigoureuse favorise la désorption des contaminants et le nettoyage des particules de sol par l'action des surfactants sur la tension de surface de la solution lavante (voir la section 1.3 sur les agents tensioactifs). Les surfactants agissent sur deux fronts, à savoir la mobilisation des contaminants et leur solubilisation dans la solution de lavage (Ang et Abdul, 1991) et plusieurs études ont montré leur efficacité pour la récupération de composés hydrophobes comme des huiles à transmission (Abdul *et al.*, 1990) et des biphényles polychlorés (BPC) (Abdul et Ang, 1994).

Une unité de flottation permet de séparer le sol propre des fines et des contaminants qui se concentrent dans une phase légère qui remonte à la surface par suite de bullage dans le mélange. Le sol traité est ensuite envoyé à une étape de polissage, comme un traitement en biopile si les contaminants sont biodégradables ou directement réutilisé. La solution de lavage contenant les fines, les contaminants et le surfactants sont traitées (et généralement recirculées) soit par déshydratation et enfouissement/stabilisation du gâteau (BIOTROL® Soil Washing System) ou encore dans un bioréacteur (BIOTROL® Soil Washing System, BioGenesis<sup>SM</sup> Soil and Sediment Washing Process) (U.S.EPA, 1996).

#### 1.2.1.1 Avantages

Les principaux avantages du procédé résident sur sa grande capacité de traitement (15 à 40 tonnes/heures, (Raghavan *et al.*, 1990) et sa flexibilité pour l'adapter au traitement de différentes contaminations (U.S.EPA, 1989). De plus, cette méthode est clairement identifiée par l'U.S.EPA (1998) comme étant une

alternative de loin préférable à la simple mise en décharge ou à la stabilisation des sols.

#### 1.2.1.2 Limitations

La technologie demeure limitée dans le cas où le contenu en matières humiques (matière organique) et en argile est élevé (U.S.EPA, 1998). En effet, ces fractions forment généralement les résidus de lavage et doivent soit être traitées sous une autre forme (réacteur en phase boueuse), soit mises en décharge ou stabilisées. Les vendeurs de technologies consultés sur la base de données VISITT de l'Agence de protection environnementale américaine s'entendent généralement pour fixer à 20% (v/v) le contenu maximal en matière organique d'un sol et à 40% le contenu en particules fines de moins de 63 microns (U.S.EPA, 1992), mais certaines entreprises affirment pouvoir traiter des sols contenant jusqu'à 50% d'argile (U.S.EPA, 1996). L'agence américaine mentionne une plage de distribution optimale des particules de sol s'étendant de 0,24 à 2mm (U.S.EPA, 1998).

La prédiction de l'efficacité du traitement à l'aide d'un surfactant est faible et les données permettant de corréler les propriétés d'un agent tensioactif et son action sur un sol contaminé ne sont pas étayées (Selvakumar *et al.*, 1995). Des études de traitabilités sont donc nécessaires pour chaque sol contaminé. Parmi les critères de sélection, la biodégradabilité et la non toxicité du surfactants et de ses produits de dégradation sont de première importance. En effet, si certains surfactants synthétiques sont biodégradables, il fut découvert que leur produits de dégradation étaient parfois plus toxiques que leur précurseur (Renner, 1997). Ainsi, les alkylphénol éthoxylés (APE, nonioniques), qui figurent parmi les



agents tensioactifs les plus usés à travers le monde, sont le sujet d'un bannissement à travers l'Europe (Renner, 1997). Les sous-produits de dégradation de ces composés se montrent plus persistants, moins solubles et près de dix fois plus toxiques que le produit initial. Il y a cependant divergence d'opinions entre les communautés scientifiques européennes et américaines sur la persistance et la bioaccumulation des métabolites de dégradation des alkylphénols éthoxylés dans l'environnement. D'un côté, les scientifiques industriels américains citent des recherches indiquant que les centres de traitement des eaux traitent efficacement les alkylphénols éthoxylés et que les métabolites pénétrant l'environnement ne sont pas persistant. Tandis que de l'autre côté, les scientifiques académiques européens soulèvent plusieurs recherches montrant la persistance des métabolites et leur bioaccumulation dans l'environnement (Renner, 1997).

Par conséquent, la technologie génère une solution aqueuse possiblement toxique selon les produits de lavage utilisés qui nécessite un traitement supplémentaire. Les résidus de solution de lavage dans le sol traité peuvent également être présents à des niveaux demandant une étape de traitement du sol supplémentaire (U.S.EPA, 1998). Enfin, les produits chimiques employés dans les solutions de lavage peuvent tuer les microorganismes indigènes au sol et entraver une étape de polissage du sol par biotraitement (U.S.EPA, 1993).

Enfin, les coûts associés à l'achat de produits chimiques peuvent représenter un part appréciable (jusqu'à 40%) du coût total de traitement des sols (voir la section 1.3.1.6).

### 1.2.1.3 Capacité de traitement et coût de la technologie

Les équipements employés dans la technologie du lavage de sol proviennent de l'industrie minière qui procède à l'extraction des métaux. Incidemment, ces équipements ont de fortes capacités de production et sont conçus pour le traitement de fortes charges, ce qui les rend difficilement disponibles à petite échelle, ainsi que le reflètent les informations relatives aux vendeurs de technologies (U.S.EPA, 1994). Le seuil de rentabilité d'une chaîne de traitement par lavage de sol est d'environ 25 t/heure (The Hazardous Waste Consultant, 1993).

Le coût à la tonne de sol traité varie de 100\$ à 250\$, incluant l'excavation (U.S.EPA, 1991 ; U.S.EPA, 1992 ; Van Benschoten *et al.*, 1997).

En résumé, les sols contaminés aux hydrocarbures peu solubles ne peuvent actuellement être traités directement par dégradation en raison des forces capillaires qui retiennent les composés hydrophobes dans les pores du sol. La technologie du lavage de sol permet de concentrer la contamination dans un volume restreint de sol par séparation des fractions où les contaminants se répartissent différemment. Les fractions les plus fines retiennent plus fortement les polluants dont la mobilisation et la solubilisation doivent être réalisées par le biais d'agents tensioactifs qui diminuent l'attraction des particules de sol sur les composés.

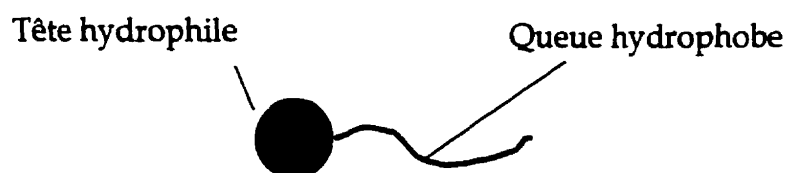
### 1.3. LES AGENTS TENSIOACTIFS

---

Les caractéristiques et les principes d'action des agents tensioactifs font l'objet de cette section. Les agents tensioactifs sont d'abord présentés d'une façon générale, et ensuite en fonction de leur mode de synthèse qui peut être chimique ou biologique.

#### 1.3.1. STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS

Les agents tensioactifs sont des molécules amphiphiles dotées d'une extrémité hydrophile, généralement constituée de groupements polaires, comme les sucres et les alcools, et d'une extrémité hydrophobe formée d'acides gras et de chaînes aliphatiques. Ces deux extrémités sont respectivement associées à la tête et la queue de la molécule (figure 1.5). Le terme surfactants, qui est fréquemment utilisé pour désigner les agents tensioactifs, dérive de la contraction des termes anglais *surface-active agents*.



**Figure 1.5** Molécule de surfactants

### 1.3.1.1 Tension de surface : théorie

La *tension de surface* est définie comme la force attirant les molécules vers l'intérieur d'un corps (Kouloheris, 1989). Une molécule au centre d'un verre d'eau subit uniformément les forces d'attraction moléculaires des autres molécules environnantes. Par contre, une molécule d'eau en surface du liquide n'est entourée que partiellement des autres molécules d'eau. Elle ne subit leur attraction que dans une direction, ce qui induit une cohésion moléculaire et une orientation. La tension de surface est responsable de la résistance d'un liquide à la pénétration (Kouloheris, 1989).

Schématiquement, la tension de surface peut être représentée par le travail exercé sur un film liquide maintenu sur un cadre métallique (fig.1.6). L'aire du film ( $A$ ) est modifiée en glissant un autre fil métallique le long du cadre fixe. La force appliquée pour changer l'aire est proportionnelle au travail ( $W$ ) (eq.1.5). Le signe négatif implique que le travail est fait sur le système, par exemple en appliquant une agitation constante sur une solution d'huile et d'eau afin de maintenir un mélange. Toutefois, si l'agitation est interrompue, le mélange reviendra à son état initial où l'aire entre les deux phases est à son minimum.

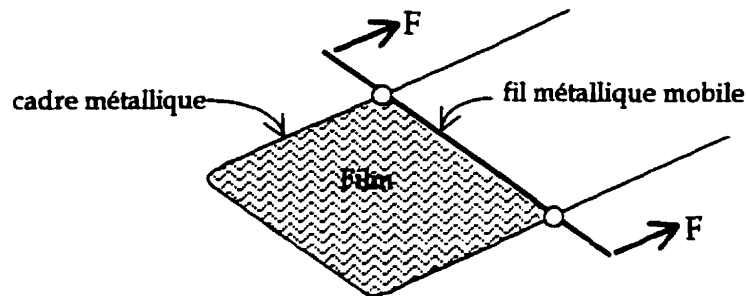
$$\delta W = - \sigma dA \quad (\text{eq.1.5})$$

Où :

$W$  = travail (Nm)

$\sigma$  = tension de surface (Nm<sup>-1</sup>)

$A$  = aire de la surface du film (m<sup>2</sup>)



**Figure 1.6** Représentation schématique illustrant le travail appliqué sur la surface d'un film. SOURCE: (Sonntag et Van Wilen, 1992).

Mathématiquement, la tension de surface ( $\sigma$ ) est définie par l'expression suivante (éq.1.6) (Margaritis *et al.*, 1979) :

$$dG_s = \sigma dA \quad (\text{éq. 1.6})$$

Où:

$dG_s$  : variation de l'énergie libre de surface (Nm)

$\sigma$  : tension de surface de la solution (Nm<sup>-1</sup>)

$dA$  : variation de l'aire de la surface (m<sup>2</sup>)

L'énergie libre de surface représente la différence entre l'énergie contenue dans les molécules au centre d'un composé et celles en surface (Kouloheris, 1989). Par conséquent, la diminution de l'aire interfaciale entre deux liquides immiscibles a pour effet d'augmenter considérablement l'énergie libre du système (Margaritis *et al.*, 1979), puisque plus de molécules se retrouvent en surface ou

aux interfaces. Or pour qu'un système soit à l'équilibre, les fonctions de Gibbs (énergie libre) des deux phases en contact doivent être égales (Sonntag et Van Wilen, 1992). Mais comme le montrent les équations, deux liquides purs immiscibles ne peuvent former une émulsion en l'absence de travail mécanique. Pour ce faire, il faut agir sur la tension de surface pour d'augmenter l'aire interfaciale entre les deux liquides. La présence d'un troisième composant est essentielle pour stabiliser le système en émulsion (Rosen, 1989). Ce troisième composant est qualifié d'agent émulsifiant et est généralement un surfactant.

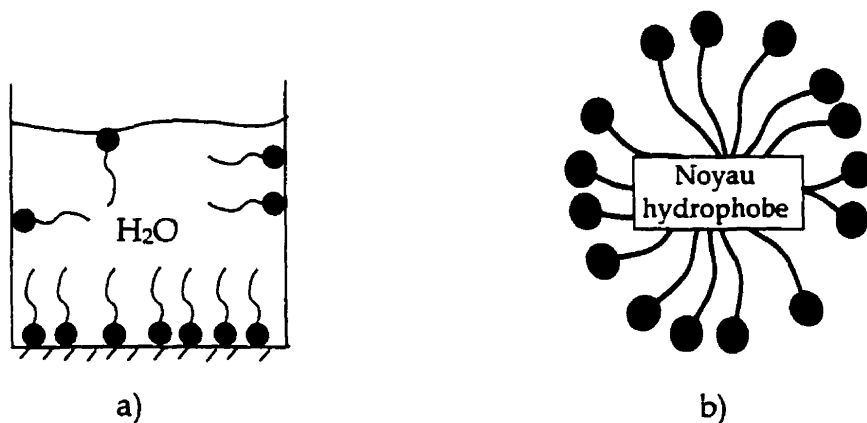
La tension de surface de l'eau distillée pure est d'environ  $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (ou  $\text{dynes}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et la tension interfaciale entre le n-hexadécane et l'eau est d'environ  $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Margaritis *et al.*, 1979). Les surfactants en solution aqueuse font typiquement diminuer ces valeurs à 30 à  $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Parkinson, 1985) et à  $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (Margaritis *et al.*, 1979) respectivement.

#### 1.3.1.2 Formation de micelles

Dans une solution de deux liquides de polarités différentes, les molécules de surfactants ont tendance à se répartir de façon orientée à l'interface entre les deux phases et à y former un film structuré (figure 1.7). La présence de ce film agit directement sur la tension de surface : la tension de surface à l'interface liquide/liquide est définie par la tension interfaciale, tandis que la tension de surface à l'interface gaz/liquide réfère à la tension superficielle (Gerson, 1993 ; Parkinson, 1985).

Au moment où toutes les interfaces du milieu sont saturées, les molécules de surfactants s'associent entre elles et forment des macromolécules nommées

micelles (figure 1.7 b) (Edwards *et al.*, 1991). Selon l'orientation des têtes et des queues, le centre de chaque micelle (noyau) forme un micromilieu hydrophile ou hydrophobe au sein d'une matrice de polarité inverse. Ainsi, une émulsion du type lipide dans eau (o/w, pour "oil in water"), à l'exemple du lait, ou eau dans lipide (w/o, pour "water in oil"), à l'instar du beurre, sera favorisée (Kachholz et Schlingmann, 1987). Le type o/w est celui permettant l'émulsion d'hydrocarbures dans l'eau.



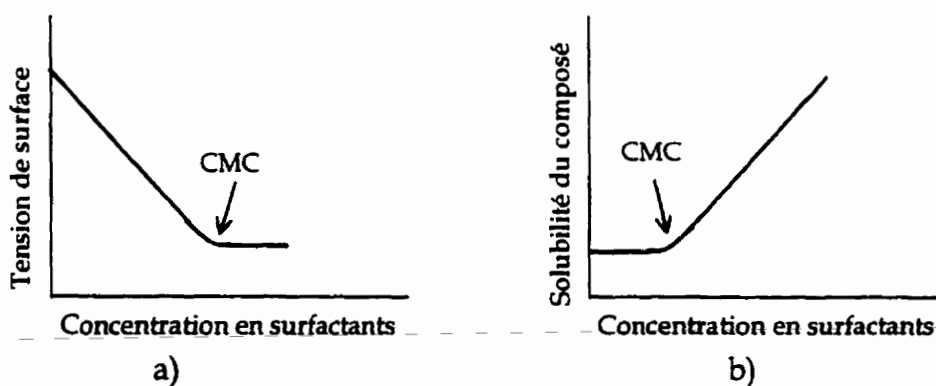
**Figure 1.7** Organisation des monomères. a) Film de surfactants b) Coupe d'une micelle sphérique (o/w).

### 1.3.1.3 Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique représente la concentration où la première micelle de surfactants est formée (Margaritis *et al.*, 1979). En faibles concentrations, les surfactants peuvent se présenter sous forme de monomères ou sous la forme de leurs ions. Au fil de l'augmentation de la concentration en surfactants, les molécules se répartissent sur les interfaces disponibles dans le milieu (parois, interface gaz-liquide, solide, etc.), jusqu'à l'atteinte d'un point de

saturation où elles forment des micelles et qui caractérise la concentration micellaire critique (CMC).

Elle est représentée par un changement abrupt de la pente de la droite de la tension de surface de la solution en fonction de la concentration (figure 1.8a). Elle est également apparente lorsque la solubilité d'un composé normalement insoluble est tracée en fonction de la concentration en surfactants qui le solubilise: la solubilité est alors très faible en-deçà de la CMC et augmente rapidement au-dessus (fig. 1.8b), indiquant que la solubilisation est un phénomène micellaire (Georgiou *et al.*, 1992 ; Rosen, 1989).



**Figure 1.8** Concentration micellaire critique

Pour mesurer l'efficacité d'un surfactant par rapport à un autre, on compare les valeurs de CMC respectives (Parkinson, 1985) : plus la CMC est atteinte à de faibles concentrations en surfactants, plus celui-ci sera efficace (en terme de rendement) à solubiliser un composé par le biais des micelles.



#### 1.3.1.4 Solubilisation

La solubilisation est décrite par Rosen (1989) comme la dissolution spontanée d'une substance par interaction réversible avec les micelles d'un surfactant à l'intérieur d'un solvant pour former une solution isotropique stable où l'activité thermodynamique du soluté sera réduite. La solubilisation permet donc le passage en solution d'une substance normalement insoluble dans un solvant donné, comme de l'huile dans de l'eau. Par rapport aux surfactants en concentration supérieure à la CMC, elle s'explique par la présence du noyau hydrophobe des micelles, au sein duquel un composé non-polaire aura plus d'affinités qu'au sein de la phase aqueuse l'entourant. En raison de leur moindre affinité avec le noyau hydrophobe, les composés modérément solubles sont plutôt solubilisés par le biais des parois des micelles, d'une façon analogue à de l'adsorption (Rouse *et al.*, 1995). Appliquées aux mélanges d'hydrocarbures, ces deux types de solubilisation contribuent à augmenter leur concentration en milieu aqueux.

Le *potentiel de solubilisation* représente la capacité des micelles d'un surfactant à augmenter la concentration totale d'un composé hydrophobe dans la phase aqueuse au-delà de sa limite de solubilité. Elle est quantifiée par le coefficient de partition micelle-eau  $K_M$  (eq.1.3) qui indique la répartition des hydrocarbures entre les phases micellaire et pseudo-aqueuse (Edwards *et al.*, 1991 ; ROUSE *et al.*, 1995). La phase pseudo-aqueuse étant la phase aqueuse contenant les micelles de surfactants.

Le *ratio molaire de solubilisation* (MSR) est cependant plus facile à mesurer et représente le nombre de moles de composé organique solubilisées par mole de surfactants ajoutés à la solution (éq.1.4) (Edwards *et al.*, 1991). L'augmentation de solubilité due à la présence de surfactants peut être très importante. Par exemple, la solubilité aqueuse du trichloroéthylène (TCE) à 15°C augmente de 980 mg/l à 19 600 mg/l en présence d'une solution 0,5M de sodium dodécylsulfate (SDS), un surfactant synthétique (West et Harwell, 1992).

*Coefficient de partition micelle-eau :*

$$K_M = X_M / X_a \quad (\text{éq.1.3})$$

Où:

$X_M$ : Fraction molaire d'hydrocarbure dans la pseudo-phase micellaire

$X_a$ : Fraction molaire d'hydrocarbure dans la pseudo-phase aqueuse

*Ratio molaire de solubilisation (MSR) :*

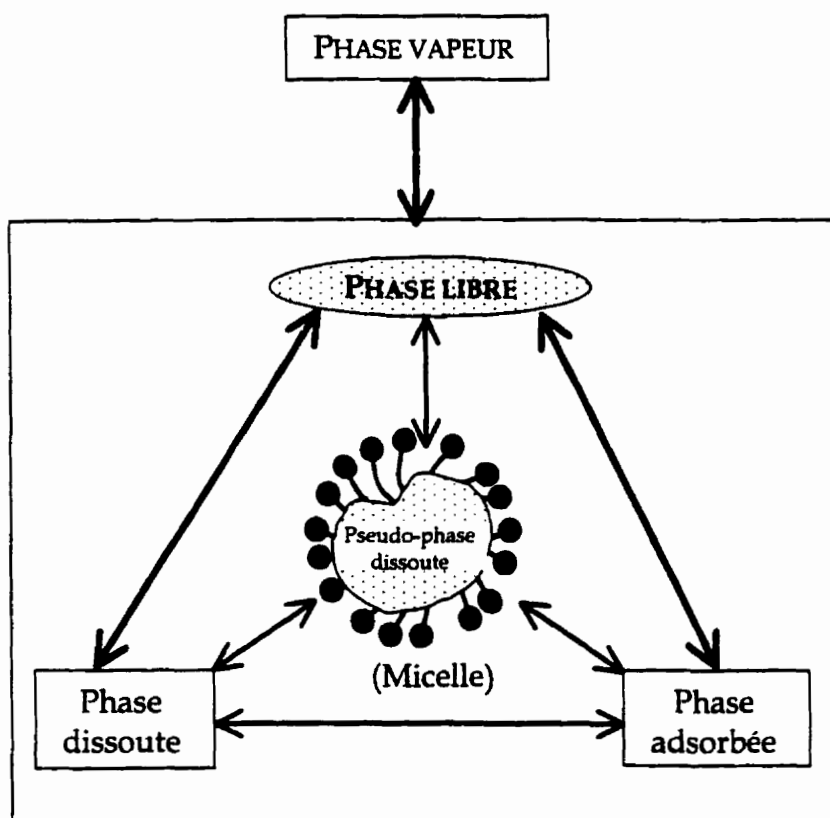
$$MSR = (S_i - S_{i,CMC}) / (C_{surf} - CMC) \quad (\text{éq.1.4})$$

Où:

$S_i$ : Solubilité apparente de l'hydrocarbure  $i$  dans la solution

$S_{i,CMC}$ : Solubilité apparente de l'hydrocarbure  $i$  à la CMC

$C_{surf}$ : Concentration en surfactant dans la solution



**Figure 1.9** Répartition des composés hydrophobes en présence de surfactants.

#### 1.3.1.5 Émulsification

La propriété la plus étudiée des agents tensioactifs à des fins d'application industrielle demeure la formation d'une émulsion à partir de deux phases immiscibles. Ainsi, leur usage est largement répandu à des fins d'agent stabilisant dans des produits commerciaux tels les peintures, les huiles

lubrifiantes, les polishes, les pesticides (Kouloheris, 1989) et les produits alimentaires (crème glacée, margarine, etc.) les cosmétiques, qui se présentent tous sous forme d'émulsion. (Rosen, 1989).

Une émulsion se caractérise par une suspension stable de particules d'un liquide au sein d'un autre liquide avec lequel il ne peut se mélanger. Les particules en suspension composent la phase discontinue et le solvant, la phase continue (Kachholz et Schlingmann, 1987). La formation de l'émulsion implique la destruction de l'interface stable entre deux liquides initialement immiscibles et l'augmentation de l'aire interfaciale entre eux. Le rôle de l'agent émulsifiant est de maintenir cet état thermodynamiquement instable (r.f. éq. 1.6) pour une durée de temps allant de quelques minutes à quelques années, suivant l'application désirée (Rosen, 1989).

La stabilité du mélange est définie par la résistance des gouttelettes de la phase dispersée à la coalescence et est liée à la compacité du film interfacial formé par l'agent émulsifiant. À l'instar d'un sable de granulométrie variée, un mélange de différentes molécules de surfactants s'agenceront entre elles de façon complémentaire en maximisant la compacité du film. C'est pourquoi il est préférable de combiner deux types de surfactants plutôt que d'employer un type de surfactants hautement purifié (Rosen, 1989). La migration des particules en surface du mélange, comme de la crème sur du lait, n'est pas considérée comme une instabilité de l'émulsion mais comme un résultat de la densité plus faible des particules de la phase dispersée (Rosen, 1989).

Enfin, la taille des particules dispersées distingue deux types d'émulsion : microscopique et macroscopique. L'apparence visuelle distingue la microémulsion (0,01 à 0,20  $\mu\text{m}$  de diamètre) qui est transparente ou semi-transparente, de la macroémulsion (0,2 à 50  $\mu\text{m}$ ), qui est plutôt opaque et d'apparence laiteuse (Rosen, 1989). Une microémulsion sera généralement plus stable qu'une macroémulsion, où les gouttelettes auront plus de facilité à coalescer. La séparation des deux phases et la récupération de la phase organique sont par conséquent favorisées dans une macroémulsion (Treybal, 1980). La stabilité d'une émulsion ne peut être mesurée quantitativement que par le taux de coalescence des gouttes de la phase dispersée, qui se mesure en comptant le nombre de gouttelettes par unité de volume de solution en fonction du temps (Rosen, 1989).

#### 1.3.1.6 *Caractéristiques des agents tensioactifs synthétiques*

Les surfactants synthétiques sont classés selon la nature ionique de leur tête hydrophile, qui contrôle leur potentiel d'adsorption sur les particules de sol. Ils se répartissent donc en quatre groupes : ionique (tête hydrophile acide), cationique (tête hydrophile basique), non ionique (aucune charge) et amphotère (tête hydrophile acide et basique) (Kouloheris, 1989 ; Selvakumar *et al.*, 1995). En général, le pouvoir de solubilisation par le biais des micelles suit l'ordre suivant : nonionique > cationique > anionique, pour des surfactants possédant une même longueur de chaîne hydrophobe (Rosen, 1989). Des exemples typiques de surfactants synthétiques sont donnés au tableau 1.5.

Les surfactants nonioniques sont préférentiellement employés en restauration des sols parce qu'ils n'ont pas tendance à s'adsorber sur les particules de sol et à

diminuer l'efficacité du surfactant (Selvakumar *et al.*, 1995). Leur CMC est généralement plus faible, de l'ordre de 50 à 180 mg/L, que celle des composés ioniques pour lesquels elle est d'environ 2000 mg/L (Legros *et al.*, 1995 ; Edwards *et al.*, 1991 ; Selvakumar *et al.*, 1995 ; West et Harwell, 1992). Mais ces études démontrent aussi que l'efficacité du surfactant à désorber les contaminants d'un sol doit être testée préalablement en laboratoire pour le sol et les contaminants en question.

**Tableau 1.6** Principaux surfactants synthétiques

<i>Catégorie</i>	<i>Surfactants typiques</i>
Anionique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Savons</li> <li>• Alkylbenzène sulfonés (ABS)</li> <li>• Alcool sulfates</li> <li>• Phosphate d'esters</li> <li>• Esters sulfonés</li> <li>• Acides gras sulfonés</li> </ul>
Cationique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydroxydes d'ammonium quaternaires</li> </ul>
Amphotère	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betaines</li> </ul>
Nonionique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carboxylate perfluoro-octyl de sodium</li> <li>• Alkylphénols éthoxylés</li> <li>• Alcools éthoxylés</li> <li>• Esters de polyoxyéthylène</li> </ul>

SOURCE : (Kouloheris, 1989).

#### 1.3.1.7 L'utilisation des agents tensioactifs pour la restauration des sols contaminés

Par leurs propriétés, les surfactants peuvent agir de deux manières pour favoriser le transfert des contaminants de la phase solide où ils sont retenus vers une phase aqueuse servant de solution lavante. Ils peuvent agir par solubilisation des contaminants dans les micelles formées à une concentration

au-delà de la CMC et par mobilisation des contaminants qui se fait par le biais de la diminution de la viscosité des composés hydrophobes (Bai *et al.*, 1997). La solubilisation est dépendante de la concentration micellaire critique au-delà de laquelle les micelles sont formées, tandis que la mobilisation dépend de la tendance des surfactants à réduire la tension de surface. C'est d'ailleurs en raison de cette aptitude que les surfactants ont été employés pour la récupération des produits pétroliers (*enhanced-oil-recovery*) (Fiechter, 1992 ; West et Harwell, 1992).

Les forces retenant les composés organiques hydrophobes dans les pores du sol sont majoritairement capillaires et proportionnelles à la tension interfaciale eau-NAPL (West et Harwell, 1992). L'abaissement de la tension de surface permet donc de contrer ces forces de rétention plus facilement et de faciliter la désorption des contaminants. Pour ces raisons, les surfactants synthétiques ont fréquemment été proposés et sont actuellement employés (U.S.EPA, 1998) pour la restauration de sols contaminés aux composés organiques peu solubles.

---

Par exemple, des solutions de surfactants ont été développées en laboratoire pour la récupération de phases liquides non aqueuses (NAPL) dont l'application visée est la restauration du site de Mercier (Québec) (Martel et Gélinas, 1996). À l'échelle pilote, 85% des BPC et 90% des huiles ont été retirés de sols contaminés originellement contaminés à 6200 mg/kg et 67000mg/kg, respectivement, à l'aide d'alcool éthoxylé nonionique (Witconol SN-70) (Abdul et Ang , 1994). L'amélioration de la solubilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a aussi été observée pour le naphthalène, le phénanthrène et le pyrène, en fonction de différents surfactants nonioniques de la famille des polyoxyéthylènes (Edwards *et al.*, 1991).

Cependant, des études ont montré que les surfactants synthétiques peuvent, outre former des sous-produits plus toxiques (Renner, 1997), inhiber la biodégradation des contaminants organiques (Vipulanandan *et al.*, 1995).

Leur usage semble par ailleurs limité par le coût élevé qui leur est associé (Shiau *et al.*, 1995). Par exemple, le Witconol SN-70 se transige à environs 7,00\$CDN/kg pur (Witco corp., prix de 1998), tandis que le Triton-X100 se vend à environs 4,34\$CDN/kg (Union Carbide, prix de 1998). Il s'agit de deux surfactants synthétiques non ioniques aptes à désorber les huiles et graisses minérales (Ang et Abdul, 1991 ; Clarke *et al.*). Mais en général, les surfactants synthétiques se vendent à 2,75\$/kg (Desphande et Daniels, 1995).

#### **Évaluation de la part du coût de traitement associé à l'achat de surfactants**

En prenant pour exemple un surfactant synthétique disponible à 2,75\$/kg, la part du coût de traitement à la tonne attribuable aux surfactants seulement peut être évaluée à l'aide des hypothèses suivante :

1. Seule la fraction sablonneuse du sol est lavée aux surfactants; ;
2. La proportion sol/eau de lavage pour cette fraction est de 15% (Legros *et al.* ; Selvakumar *et al.*, 1995);
3. La concentration en surfactants dans l'eau de lavage est de 0,5%(v/v) (Legros *et al.*, 1995);

Considérant des proportions de sable dans le sol de 40%, 60% et 80%, il est estimé que les coûts associés à l'achat de surfacants synthétiques seront, à la tonne métrique, de 33,33\$CDN, 50,00\$CDN et 66\$CDN respectivement. Si le coût moyen de restauration des sols par lavage de sol est de 170\$ la tonne



(incluant l'excavation ) (U.S.EPA, 1998), plus de 40% du coût de traitement est attribuable à l'achat de surfactants synthétiques. Cette proportion augmente évidemment si le coût de traitement à la tonne est moindre. Cette évaluation n'est fournie qu'à titre indicatif quant à l'importance à attribuer aux surfactants dans la technologie et des études de traitabilités devraient être réalisées pour chaque cas.

### **1.3.2. LES AGENTS TENSIOACTIFS BIOLOGIQUES**

Selon ce qui précède, la technologie du lavage de sol avec surfactants devrait être soutenue pour la restauration des sols contaminés aux hydrocarbures pétroliers semi- ou non-volatils, des composés organiques hydrophobes. Ceux-ci sont communément regroupés sous les  $C_{10}$ - $C_{50}$ . Mais il apparaît également que son application est freinée pour deux raisons, soit le coût associé à l'achat des surfactants et les dommages potentiels que ces derniers peuvent causer à l'environnement et à un traitement biologique de polissage.

La substitution des surfactants synthétiques par des surfactants biologiques produits par des microorganismes répond à la seconde. Leur intégration dans les procédés de restauration des sols a fait l'objet de nombreuses mentions dans la communauté scientifique (Banat, 1995 ; Falatko et Novak, 1992 ; Gerson, 1993 ; Ghurye et Vipulanandan, 1994 ; Harvey *et al.*, 1990 ; Kommalapati et Roy, 1997 ; Lin, 1996 ; Mattei et Bertrand, 1985 ; Mihelcic *et al.*, 1995 ; Miller et Zhang, 1997 ; Robinson *et al.*, 1996 ; Thangamani et Shreve, 1994 ; Van Dyke *et al.*, 1991 ; Vipulanandan *et al.*, 1995 ; West et Harwell, 1992). Malgré tout, le marché actuel des surfactants est presque entièrement dominé par les surfactants d'origine synthétique (Desai et Banat, 1997).

### 1.3.2.1 Caractéristiques

Les caractéristiques physiques des biosurfactants sont similaires à celles de leur pendant synthétique. Ils abaissent la tension de surface de l'eau distillée de 72 mN/m à environs 30 mN/m et présentent des valeurs de concentration micellaire critique inférieures à celles des surfactants synthétiques (Desai et Banat, 1997 ; Mihelcic *et al.*, 1995). On rapporte entre autres des valeurs de CMC de 1 à 10 mg/l pour les glycolipides, alors que le sodium dodécylsulfate (SDS) et le Triton X-100 ont des valeurs de CMC de 2100 mg/l et 130 mg/l. Les biosurfactants peuvent de surcroît résister à des conditions environnementales plus extrêmes (pH, température, pression, salinité) que les surfactants chimiques (Van Dyke et Trevors, 1991). Par exemple, les lipopeptides produits par *Bacillus licheniformis* JF-2 sont stables jusqu'à des températures de 75°C (Lin *et al.*, 1990) et gardent toute leur activité pour une plage de pH allant de 5,5 à 12 (Lin, 1996).

### 1.3.2.2 Structure et classification des biosurfactants

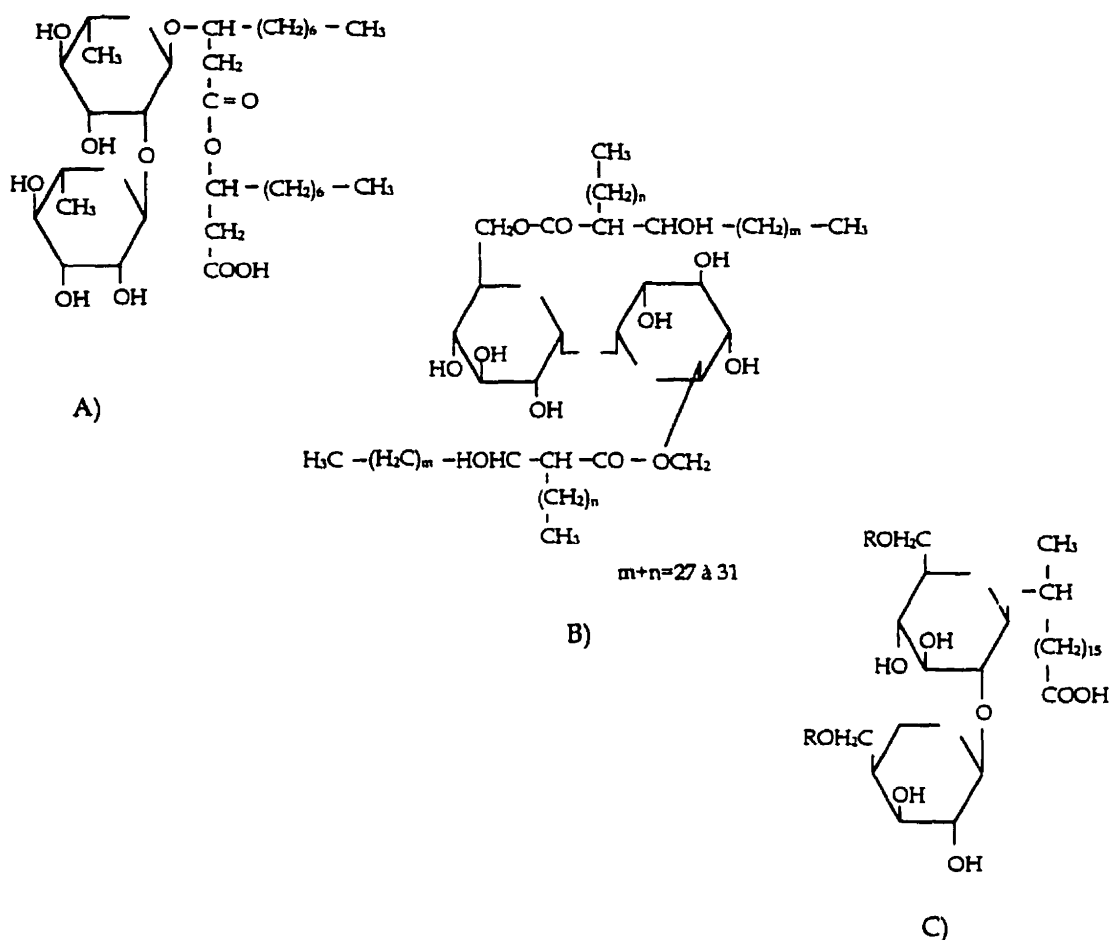
Les biosurfactants se présentent comme des mélanges complexes de protéines, lipides et hydrates de carbone. L'extrémité hydrophobe peut être un acide gras à longue chaîne, un acide gras  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxylé ou un acide gras hydroxylé. L'extrémité hydrophile, la tête de la molécule, est un hydrate de carbone, un acide carboxylique, un phosphate, un acide aminé, un peptide cyclique ou un alcool (Desai et Banat, 1997 ; Haferburg *et al.*, 1986 ; Zajic et Seffens, 1984).

De façon plus générale, la tête hydrophile est formée de mono-, di- ou polysaccharides, tandis que la queue hydrophobe est constituée d'acides gras

saturés ou insaturés. Les molécules peuvent être chargées ioniquement comme les surfactants synthétiques, mais leur classification suit la nature de l'extrémité hydrophile de la molécule.

Les grandes catégories de biosurfactants incluent les glycolipides, les lipopeptides et lipoprotéines, les phospholipides et les surfactants polymériques (Healy *et al*, 1996 ; Desai et Banat, 1997). Parmi ces catégories, les biosurfactants chargés sont principalement anioniques (rhamnolipides et sophorolipides acides). Ils peuvent être intracellulaires, comme dans le cas des mycolates de mono et di-saccharides (Hommel, 1990), mais sont généralement extracellulaires et favorisent l'émulsion ou la dispersion de la phase hydrophobe. Les biosurfactants nonioniques sont pour la plupart attachés à la paroi cellulaire et favorisent la diffusion du composé hydrophobe directement dans la cellule (KOSARIC *et al*, 1987 ; Mihelcic *et al*, 1995 ; Sylđatk et Wagner, 1987).

Les glycolipides forment la plus grande classe de biosurfactants et regroupent les rhamnolipides, les sophorolipides et les tréhalolipides (figure 1.10). Le préfixe attaché au mot lipide réfère à l'identité de l'hydrate de carbone de l'extrémité hydrophile du surfactant : sucre rhamnose, sophorose ou tréhalose. Quelques espèces de microorganismes producteurs sont mentionnés au tableau 1.7.



**Figure 1.10** Structures de quelques glycolipides. A) Rhamnolipide de type 1 de *Pseudomonas aeruginosa* : deux unités rhamnosées attachées à une chaîne de deux acides  $\beta$ -hydroxydécanoïques. B) Dimycolate tréhalose de *Rodococcus erythropolis* : un disaccharide tréhalose est lié à deux acides gras hydroxylés à longue chaîne. C) Sophorolipide de *Candida bombicola* : sophorose dimérique lié à une longue chaîne ( $C_{18}$ ) d'acide gras hydroxylé.

**Tableau 1.7** Source microbienne et tension de surface de quelques biosurfactants.

<b>Biosurfactants</b>	<b>Microorganisme</b>	<b>Tension de surface (mN/m)</b>
<b>Glycolipides</b>		
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
	Esp. <i>Pseudomonas</i>	25-30
Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i>	33
	<i>Torulopsis apicola</i>	30
Tréhalolipides	<i>R.erythropolis</i>	32-36
	<i>N.erythropolis</i>	30
	Esp. <i>Mycobacterium</i>	38
<b>Lipopeptides et lipoprotéines</b>		
Peptide-lipide	<i>B.licheniformis</i>	27
Serrawettine	<i>S.marcescens</i>	28-33
Viscosine	<i>P.fluorescens</i>	26,5
Surfactine	<i>B.subtilis</i>	27-32
<b>Acides gras et lipides neutres</b>		
Acides gras	<i>C.lepus</i>	30
Lipides neutres	<i>N.erythropolis</i>	32
<b>Surfactants polymériques</b>		
Hydrate de carbone-protéine-lipide	<i>P.fluorescens</i>	27

SOURCE: (Desai et Banat, 1997).

### **Biosurfactants vs bioémulsifiants**

Les bioémulsifiants sont souvent classés avec les biosurfactants et les termes sont fréquemment intervertis (Fiechter, 1992). Ainsi, Van Dyke et ses collaborateurs (1991) décrivent l'Émulsan, un lipopolysaccharide de haut poids moléculaire, comme un biosurfactant, tout en spécifiant qu'il n'abaisse pas la tension de surface. Desai et Banat (1997) présentent également l'Émulsan et le Biodispersan comme des surfactants microbiens mais le décrivent comme des agents dispersant ou émulsifiant. Par contre Healy et ses collègues (1996) font clairement paraître le mélange des termes en utilisant le terme Biosurfactant/Bioémulsifiant.

S'ils sont ainsi présentés, c'est que les bioémulsifiants, généralement des biopolymères comme des polysaccharides, sont fréquemment produits en parallèle avec les biosurfactants (Falatko et Novak, 1992) et forment une solution aux propriétés émulsifiantes et tensioactives.

Pour différencier les deux groupes, il faut retenir qu'un biosurfactant peut agir comme émulsifiant en stabilisant l'émulsion (voir la section 1.3.1.4). Par contre, un bioémulsifiant, s'il stabilise le mélange immiscible, ne possède pas la propriété d'abaisser la tension de surface (Van Dyke *et al*, 1991 ; Falatko et Novak, 1992) ni de structure moléculaire définie comme pour les biosurfactants (tête hydrophile-queue hydrophobe) (Hommel, 1990).

#### 1.3.2.3 Biosynthèse

Les biosurfactants sont produits par une variété de microorganismes et sont sécrétés extracellulairement ou comme partie intégrante de la paroi cellulaire (Mihelcic *et al*, 1995). Ce sont généralement des métabolites secondaires dont le rôle par rapport au microorganisme producteur n'a pas encore clairement été démontré. Mais ils peuvent jouer un rôle essentiel à la survie du microorganisme en facilitant le transport des nutriments hydrophobes (Georgiou *et al*, 1992 ; Hommel, 1990). La croissance de la biomasse et la synthèse des agents tensioactifs peut se faire à partir de composés hydrophobes, d'hydrates de carbone ou d'un mélange de ces deux groupes (Banat, 1995 ; Desai et Desai, 1993 ; Lin, 1996). Ainsi, les microorganismes producteurs ne sont pas exclusivement des dégradeurs de composés hydrophobes, mais également de glucose, d'éthanol, de sucrose ou de glycérol (Desai et Desai, 1993 ; Desai et Banat, 1997 ; Guerra-Santos *et al*, 1984 ; Harvey *et al*, 1990 ; Zhou *et al*, 1992).

La grande variété de structures entre les différents types de biosurfactants implique des voies de biosynthèses aussi diverses, qui peuvent être classées selon trois modes, suivant la synthèse *de novo* des extrémités de la molécule (Syldatk et Wagner, 1987).

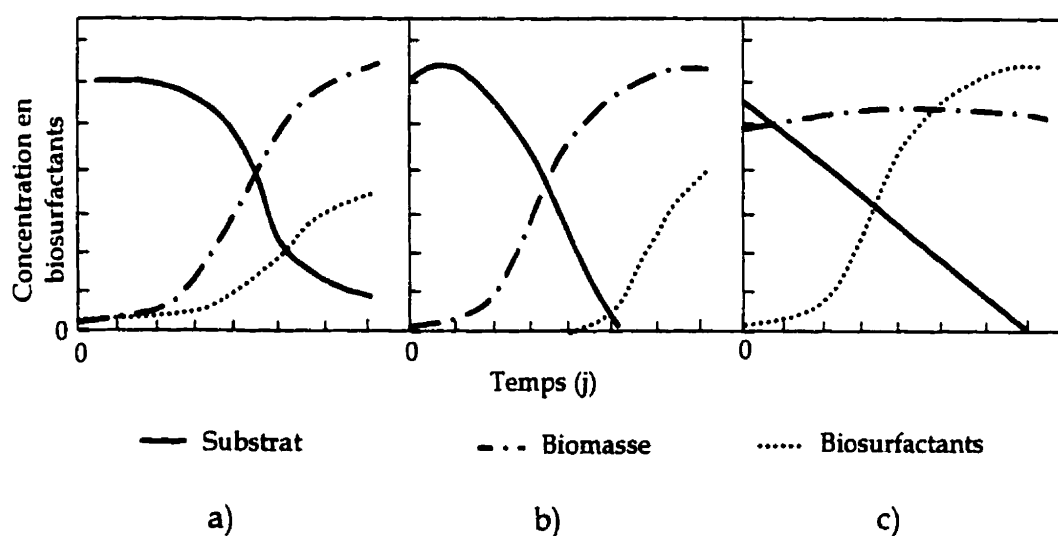
1. Synthèse *de novo* des extrémités hydrophiles et hydrophobes par deux voies indépendantes, suivie de leur combinaison pour former la molécule complète de surfactant;
2. Synthèse *de novo* de la tête hydrophile et synthèse de la queue hydrophobe à partir du substrat, puis combinaison des deux pour former la molécule de surfactant;
3. Synthèse *de novo* de la queue hydrophobe et à partir du substrat pour l'extrémité hydrophile, puis leur combinaison.

Ces différentes possibilités ont été illustrées par de nombreux exemples dans les travaux de Syldatk et Wagner (1987) et Desai et Desai (1993) que les lecteurs sont invités à consulter pour de plus amples informations.

#### 1.3.2.4 Production des biosurfactants

La production de surfactants par les microorganismes peut suivre quatre voies de synthèse : 1) associée à la croissance de la biomasse, 2) sous des conditions limitant la croissance, 3) par de la biomasse en phase stationnaire et 4) associée à l'ajout de précurseurs (Kosaric *et al*, 1987).

En général, la production n'est pas associée à la croissance de biomasse et répond à différents types de limitation, indiquant que les enzymes impliquées dans la synthèse sont normalement inhibées chez les cellules actives (Hommel, 1990). Des exemples des différents modes de production sont présentés schématiquement à la figure 1.11.



**Figure 1.11** Cinétique de différents types de fermentation pour la production de biosurfactants. a) Associée à la croissance (*Acinetobacter calcoaceticus*). b) Limitation par le substrat (esp. *Pseudomonas sp.*). c) En phase stationnaire (esp. *Torulopsis*). SOURCE:: Desai et Desai (1993).

### Production associée à la croissance

Lorsque la synthèse des biosurfactants est associée à la croissance de biomasse (figure 1.11a), des relations parallèles existent entre la croissance, l'utilisation du substrat et la production de surfactants. La production de rhamnolipides par



certaines espèces de *Pseudomonas* et *Acinetobacter calcoaceticus* suit cette cinétique (Desai et Banat, 1997).

### **Production en phase de croissance, sous conditions limitantes**

En conditions limitantes, bien que la masse cellulaire augmente, la production de biosurfactants n'est engagée que lorsqu'un ou plusieurs des composants du milieu est épuisé ou présent à une concentration limite (figure 1.11 b). Une surproduction de rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa* n'est ainsi obtenue que si l'azote et le fer sont en concentrations limitantes (Guerra-Santos *et al*, 1984 ; Reiling *et al*, 1986 ; Robert *et al*, 1989).

### **Production en phase stationnaire**

La production en phase stationnaire a lieu lorsque le taux de multiplication cellulaire égale le taux de décès des cellules et l'utilisation de la source de carbone sert en majeure partie pour la synthèse de surfactants (fig.1.11 c). Ce genre de production est intéressant au niveau de la récupération du produit (les biosurfactants), puisque les périodes de croissance et de production peuvent être séparées (Desai et Desai, 1993).

Plusieurs microorganismes obéissant à cette cinétique ont été étudiés, notamment *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 (rhamnolipides), *Candida bombicola* (sophorolipides), *Candida apicola* (sophorolipides), *Ustilago maydis* (cellobiolipides), *Rhodococcus erythropolis* (tréhalose tétraester) et *Candida antartica* (lipides mannosylerythritol) (Desai et Banat, 1997).

### **Production avec ajout de précurseur**

L'addition de précurseurs au milieu de croissance peut parfois entraîner des changements quantitatifs et qualitatifs sur la production de biosurfactants. Ainsi, l'addition de composés lipophiles aux milieux de culture de *Torulopsis magnoliae*, *Candida bombicola* et *Torulopsis apicola* ont favorisé de façon significative la production de biosurfactants (Cooper et Paddock, 1984 ; Desai et Banat, 1997 ; Lee et Kim, 1993 ; Sylđatk et Wagner, 1987). Par ailleurs, la nature des glycolipides peut être directement influencée par la source d'hydrates de carbone (Sylđatk et Wagner, 1987).

Ces cinétiques de production ne sont toutefois pas exclusives, ainsi la levure *Candida bombicola* produit des sophorolipides lorsque la concentration en azote devient limitante, et que la biomasse entre dans sa phase stationnaire de croissance (Asmer *et al*, 1988 ; Davila *et al.*, 1992). Suivant l'étude des cinétiques, divers types de production ont été évalués pour des opérations en mode cuvée, en cuvée alimentée ou en continu (Desai et Banat, 1997). Mais ces modes de production impliquent une récupération du produit particulière, dont les principaux types sont mentionnés brièvement à la section suivante.

#### **1.3.2.5 Récupération des biosurfactants**

Les méthodes de récupération des biosurfactants sont variées et dépendent de la cinétique de production. Les méthodes les plus courantes utilisent l'extraction à l'aide de solvants pour récupérer les biosurfactants. Les solvants sont nombreux et incluent des solutions de chloroforme-méthanol, dichlorométhane-méthanol, butanol, acétate d'éthyle, pentane, hexane, acide acétique et ether (Desai et Banat, 1997). Les autres techniques font appel à des

produits chimiques favorisant la précipitation des biosurfactants. Parmi ces produits figurent le sulfate d'ammonium, des acides et de l'acétone. Certaines méthodes physiques de séparation ont également été évaluées, comme la centrifugation, l'adsorption et la filtration (Desai et Banat, 1997).

L'application de ces méthodes de récupération et de purification à un niveau industriel peut faire augmenter considérablement le coût de production des biosurfactants et ce jusqu'à 60% (Desai et Banat, 1997). C'est pourquoi il est de plus en plus proposé d'employer des préparations brutes de biosurfactants (Cooper et Paddock, 1984) pour pénétrer le vaste marché des surfactants qui se chiffre à environs 9,4 milliards \$ par année au niveau mondial (Desai et Banat, 1997) dont 1,7 milliards \$ aux Etats-Unis seulement (Lin, 1996).

Par ailleurs, la problématique de récupération ne se joue pas qu'au niveau économique. En effet, l'objectif initial, qui est de substituer les surfactants chimiques par des surfactants biologiques, suit des motivations environnementales. C'est pourquoi l'utilisation de solvants pour la récupération/purification des biosurfactants, générant des sous-produits autrement plus toxiques (composés chlorés comme le chloroforme et le dichlorométhane) que les surfactants chimiques initiaux, rendrait la démarche globale inconvenante.

### 1.3.2.6 Positionnement des biosurfactants en environnement

L'intégration des biosurfactants dans les formulations des produits pétroliers et dans les procédés de récupération (*Microbial-enhanced-oil-recovery*) fut instigatrice de leur usage en environnement et annoncèrent leur potentiel d'action (Haferburg *et al*, 1986 ; Van Dyke *et al*, 1991). Les biosurfactants aident à la récupération de l'huile brute en diminuant la tension de surface, ce qui prévient la migration de l'huile par capillarité dans les fissures du roc souterrain (Van Dyke *et al*, 1991). Mais dans ce domaine également l'utilisation des biosurfactants est marginale, bien qu'une compagnie commercialise les biosurfactants de *B. licheniformis* JF-2 pour l'industrie pétrolière (Desai et Banat, 1997).

L'habileté de certains biosurfactants à mobiliser et émulsifier les composés peu solubles fut démontrée (Bai *et al.*, 1997 ; Banat, 1995 ; Cooper et Paddock, 1984 ; Falatko et Novak, 1992 ; Harvey *et al.*, 1990 ; Mattei et Bertrand, 1985 ; Miller et Zhang, 1997 ; Thangamani et Shreve, 1994) et commentée dans de nombreuses études (Banat, 1995 ; Desai et Banat, 1997 ; Georgiou *et al.*, 1992 ; Healy *et al.*, 1996 ; Mihelcic *et al.*, 1995). Ainsi, les rhamnolipides produits par *Alcaligenes eutrophus* se sont montrés efficaces pour l'augmentation de solubilité des BPC et leur minéralisation (Robinson *et al.*, 1996). Les rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa* ont amélioré la récupération d'hexadécane résiduel dans une colonne de sable, par rapport au sodium dodécyl sulfate (SDS) et au sorbitan monooléate, deux surfactants synthétiques (Bai *et al.*, 1997). Des expériences similaires avec des bouillons de culture contenant des surfactants de *Rhodococcus* ST-5 et de *Bacillus* AB-2 ont permis de récupérer 95% de l'huile brute résiduelle contenue dans une colonne de sable. D'un autre côté, d'autres

recherches ont établi que les rhamnolipides (anioniques) s'adsorbent substantiellement sur le sol (Banat, 1995).

Outre la récupération des huiles pétrolières de sables bitumineux, les efforts de recherches sont largement concentrés sur des utilisations *in situ* des biosurfactants, où les microorganismes pourraient à la fois mobiliser les contaminants et les dégrader. Mais les résultats sur ce dernier point sont contradictoires et certaines études démontrent l'effet inhibiteur des biosurfactants sur la biodégradation (Deschênes *et al.*, 1995 ; Falatko et Novak, 1992), alors que d'autres ont montré l'inverse (Falatko et Novak, 1992 ; Zhang et Miller, 1992). Il semble que pour améliorer la biodégradation des hydrocarbures par des microorganismes producteurs de surfactants, il est nécessaire de les faire croître et produire sur des hydrocarbures (Falatko et Novak, 1992). Mais à des fins de lavage de sol où la dégradation des polluants n'est pas prévue *in situ*, les biosurfactants montrent un excellent potentiel.

Enfin, ainsi que le résumant Healy et ses collaborateurs (1996), le principal facteur limitant l'usage des biosurfactants demeure l'aspect économique d'une production à grande échelle, dont les principaux obstacles sont :

1. Faibles rendements de production par rapport au substrat(s);
2. Faibles rendement volumiques (solutions diluées);
3. Importants investissements de capitaux;
4. Recours à la stérilisation des milieux;
5. Problèmes de contrôle de procédé comme la formation de mousse;

6. Problèmes de récupération de produit et de purification;
7. Problèmes de caractérisation des produits finis en raison de leur complexité chimique.

Le choix d'un microorganisme producteur de biosurfactants doit donc tenter de répondre au plus grand nombre de ces limitations. La levure *Candida bombicola* ATCC 22214 semble offrir les caractéristiques appropriées, dont une revue est présentée ci-après. Le choix s'est basé sur trois éléments principaux, soit la productivité du micro-organisme, ses caractéristiques microbiologiques pour une production non-stérile et son potentiel pour une production à partir de rejets industriels.

### **1.3.3. CANDIDA BOMBICOLA ATCC 22214**

Au début des années 1960, quelques travaux rapportaient la production de glycolipides par des levures du genre *Torulopsis* (Gorin *et al.*, 1961 ; Tulloch *et al.*, 1962). La levure fut plus tard reclassée sous le genre *Candida* (Desphande et Daniels, 1995). On nota rapidement, pour des fermentations de 3 à 7 jours en laboratoire, le rendement élevé des levures par rapport à celui des bactéries (Cooper et Zajic, 1980). Les travaux les plus récents rapportent des productivités allant jusqu'à plus de 300 000 mg/l en mode cuvée alimentée (Davila *et al.*, 1997) pour une période 8 jours de production. À titre comparatif, les productivités rapportées pour les bactéries varient de 100 mg/l à 5 000 mg/l pour des durées de production similaires (Haferburg *et al.*, 1986). C'est en 1982 que des études spécifiques à l'espèce *Candida bombicola* et sa capacité à produire des surfactants biologiques à partir d'alcanes ont été complétées (Cooper et Paddock, 1984).

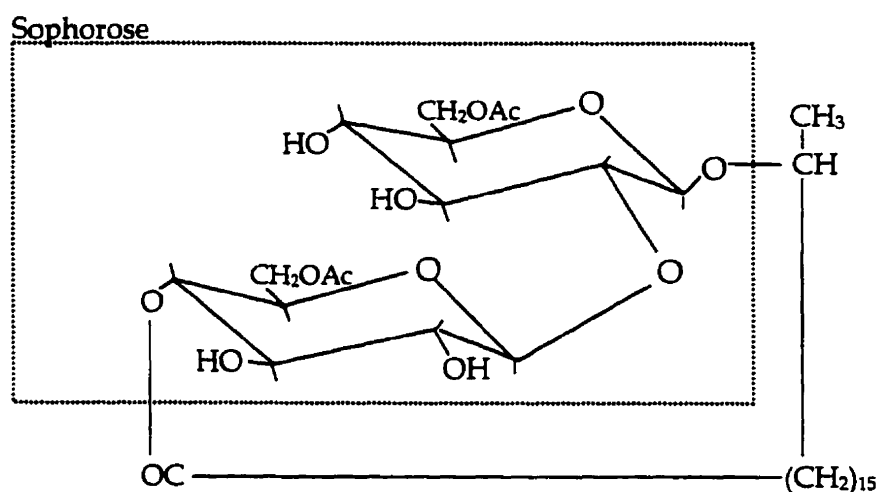
Par ailleurs, par opposition aux bactéries qui sont majoritairement étudiées pour la production de biosurfactants (*Pseudomonas aeruginosa*), le pH optimal pour la croissance des levures est d'environ 4,5 (Vandemark et Batzing, 1987). Sachant que de tels pH ne sont généralement pas favorables à la croissance bactérienne (Vandemark et Batzing, 1987), il serait possible de faire croître la levure sans avoir à stériliser le milieu et qu'elle conserve néanmoins une masse critique par rapport aux bactéries.

Enfin, quelques études récentes ont porté sur la production de biosurfactants de *C. bombicola* à partir de sous-produits de production de l'industrie agro-alimentaire comme le lactose (Zhou et Kosaric, 1993) et les rejets de l'industrie de l'huile d'olive (Zhou et Kosaric, 1995) ou de la graisse animale (Desphande et Daniels, 1995). De telles études ne semblent pas avoir été faites pour les autres micro-organismes où le glucose ou des alcanes purs sont toujours les substrats employés. *Candida bombicola* est clairement identifié comme un micro-organisme à fort potentiel de production économiquement viable, en raison des sources de substrat "bas de gamme" pouvant être employés (Cooper et Paddock, 1984 ; Kosaric *et al.*, 1984). Par contre, une purification des composés individuels du mélange de sophorolipides, extrait à l'acétate d'éthyle, serait prohibitive (Cooper et Paddock, 1984). Enfin, toutes les recherches publiées à ce jour portent sur des productions en milieu préalablement stérilisé.

### **Structures des biosurfactants produits par *Candida bombicola***

Les biosurfactants produits par la levure sont des sophorolipides, du groupe des glycolipides (Tulloch *et al.*, 1962). Les sophorolipides se présentent comme un mélange complexe de différents groupes structuraux, dont douze ont été identifiés (Asmer *et al.*, 1988 ; Davila *et al.*, 1993), mais dont l'existence de classes

supplémentaires est suspectée (Davila *et al.*, 1993). Parmi ces groupes, les formes de sophorolipides SL-1 et SL-7 dominent lors des productions (Asmer *et al.*, 1988). Ces deux formes sont lactones et nonioniques. La structure d'un sophorolipide SL-1 est illustrée à la figure 1.12. En raison des groupes acétylés, la forme SL-1 est peu soluble en phase aqueuse (environ 4 g/l à pH 3,5 (Davila, 1992)) et les formes non acétylées plus solubles sont préférables pour la récupération des produits pétroliers (Klekner *et al.*, 1991).



**Figure 1.12** Structure d'un sophorolipide de forme SL-1 (Ac=acétate).

Les techniques analytiques peuvent être complexes, allant de la simple gravimétrie à la chromatographie liquide à haute performance avec détecteur ELS (*evaporative light-scattering*), mais la récupération du produit sans grande purification est possible (Davila *et al.*, 1992 ; Desphande et Daniels, 1995).



## Synthèse

La production de sophorolipides par *Candida bombicola* se fait en deux étapes, où les biosurfactants sont majoritairement produits après une première phase de croissance de la levure, qui se termine après l'atteinte d'une limitation en azote dans le milieu de production (voir figure 1.11c) (Davila *et al.*, 1997). Lorsque la croissance de biomasse est freinée par le manque d'azote, l'excrétion des sophorolipides pourrait constituer une réponse au niveau d'énergie intracellulaire (Davila *et al.*, 1997). La distribution des sophorolipides dans les différentes classes structurales indiquerait les réponses graduelles des cellules envers les conditions énergétiques imposées par l'alimentation en substrats (Davila *et al.*, 1997).

La concentration en azote dans le milieu est donc primordiale pour la croissance et la production, et la source d'azote elle-même est décisive (Cooper et Paddock, 1984). Ainsi, l'extrait de levure est essentiel en raison des vitamines (thiamine, acide pantothénique, pyridoxyne, etc.) qu'il contient, mais il peut être remplacé en partie par d'autres sources comme de l'urée (Zhou *et al.*, 1992).

Dès les premières recherches sur la levure, les résultats ont montré l'avantage d'employer une combinaison de glucose et d'huile végétale, qui agit comme précurseur. En l'absence de l'un ou l'autre des substrats, seule une production très faible de sophorolipides (de 2 000 à 4 000 mg/l) est obtenue (Cooper et Paddock, 1984 ; Zhou et Kosaric, 1993). Néanmoins, l'alimentation de la seconde source de carbone durant la fin de la phase de croissance des cellules est avantageuse (Rau *et al.*, 1996). Enfin, à des concentrations d'environ 10% en

hydrates de carbone et en lipides, la production se chiffre au-delà de 70 000 mg/l en 5 jours (Cooper et Paddock, 1984 ; Zhou *et al.*, 1992).

Plusieurs substrats furent évalués, ainsi que leur influence sur la répartition des sophorolipides dans les différentes classes structurales. Parmi les substrats employés figurent le lactose (Zhou et Kosaric, 1993), diverses huiles végétales de grade alimentaire (Zhou *et al.*, 1992), de la graisse animale (Desphande et Daniels, 1995), des acides gras (Rau *et al.*, 1996) et certains esters d'huiles végétales (Davila *et al.*, 1992). . Ces esters méthylés et éthylés sont obtenus par transesterification en conditions alcalines et hydrolyse des molécules. Tous les substrats lipidiques employés ont été efficaces, à des degrés différents, pour la production de biosurfactants.

Un ratio de la source d'hydrates de carbone sur la source de lipides inférieur à 3/1 conduit à des sophorolipides plus hydrophiles dans le mélange (Asmer *et al.*, 1988). Les données obtenues à partir d'huile de canola<sup>2</sup> (Zhou et Kosaric, 1995), d'huile de carthame (Cooper et Paddock, 1984 ; Zhou *et al.*, 1992), d'huile de tournesol et de soya (Cooper et Paddock, 1984) et d'huile d'olive (Zhou et Kosaric, 1993) montrèrent le meilleur rendement obtenu avec l'huile canola. Par contre le lactose, contenu dans le petit lait, diminua la productivité de 160 g/l à 120 g/l (Zhou et Kosaric, 1993), ce qui démontre tout de même le fort potentiel de production à partir de rejets industriels.

Les cosubstrats composés d'acides gras polyinsaturés (tournesol, lin) favorisent la production de sophorolipides de forme acide (Davila *et al.*, 1994). En

---

<sup>2</sup> Aussi appelée huile de colza.

présence d'hydrate de carbone et d'huile végétale, seul le rendement en sophorolipides est influencé par le substrat employé ; le type de sophorolipides, la concentration micellaire critique et l'abaissement de la tension de surface de l'eau demeurant relativement constants (Cooper et Paddock, 1984). Mais lorsque le cosubstrat est un ester de ces huiles, la structure des sophorolipides varie aussi et les sophorolipides produits ont un plus faible degré de formes diacétylées que les sophorolipides produits à partir de leurs huiles (Davila *et al.*, 1994). L'estérification des huiles végétales est aussi d'une grande influence sur la productivité, qui peut atteindre jusqu'à 300 000 mg/l en mode cuvée alimentée (Davila *et al.*, 1992), mais elle implique des étapes de traitement supplémentaires du substrat. L'hydrolyse des glycérides des molécules serait le facteur facilitant l'assimilation du substrat lipidique.

Enfin, les cosubstrats permettant d'obtenir les meilleurs rendements en sophorolipides sont les huiles ou les esters riches en acides gras C18:1 et C18:0 qui, à l'inverse des alcanes, ne requièrent pas d'étape d'hydroxylation (Davila *et al.*, 1994). Les sophorolipides produits à partir d'huiles contiennent invariablement une plus forte proportion de lactones diacétylés (moins solubles) que ceux produits à partir d'esters (Davila *et al.*, 1994) et le rendement en sophorolipides SL-1 demeure relativement constant, ainsi que la composition du mélange, au cours d'une même production (Klekner *et al.*, 1991). De plus fortes concentrations de composés acides sont observées à partir de cosubstrats lipidiques à fort contenu en composés d'acides gras polyinsaturés.

La concentration en oxygène dissous semble jouer un rôle significatif en cours de production (Desphande et Daniels, 1995). La nature de l'inoculum et sa

proportion pourraient éliminer la phase de latence en début de production (Desphande et Daniels, 1995).

### **Cinétique de production**

La majorité des recherches ont été réalisées en mode cuvée (Cooper et Paddock, 1984) ; (Klekner *et al.*, 1991) ; Zhou *et al.*, 1992) parce qu'elles se concentraient sur la caractérisation des produits et la formulation du milieu de production. Les publications rapportent des productions en réacteurs de 1L (Zhou et Kosaric, 1993), 2,5L (Lee et Kim, 1993), 4L (Davila *et al.*, 1993), 15L (Desphande et Daniels, 1995), 30L (Asmer *et al.*, 1988) et 50L (Rau *et al.*, 1996). Néanmoins, il s'agissait dans tous les cas de productions stériles. Parmi celles-ci, les résultats ont montré l'avantage de tirer parti du mode de synthèse des sophorolipides, qui est non associé à la croissance. En effet, le passage du mode cuvée en mode cuvée alimentée augmenta la production de biosurfactants de 80 g/l à 120 g/l, à partir de glucose et d'huile de soya (Lee et Kim, 1993).

Dans d'autres travaux (Davila *et al.*, 1992 ; Rau *et al.*, 1996), les étapes de croissance et de production furent scindées, en assumant que la croissance se fait majoritairement à partir du substrat hydrophile, et la production à partir d'un substrat lipidique. Le substrat lipidique était alimenté en continu (opération en cuvée alimentée). Les résultats ont montré que la présence des deux types de substrats était essentielle durant les deux phases. Il démontrèrent aussi qu'un ajustement de pH à 5,0 était néfaste par rapport à 3,5 et que la température optimale de fermentation était de 25°C. L'influence du pH peut être reliée à une inhibition par le produit, dont la solubilité augmente avec le pH (Davila *et al.*, 1992).

Enfin, très peu de recherches rapportent des données sur un mode de production en continu où les phases de production et de croissance sont distinctes, mais les résultats présentés sont évocateurs. Ainsi, une opération en mode continu d'un bioréacteur Chemostat de 8,5 litres alimenté en glucose et acide oléique a permis d'obtenir une concentration de 63 g/l en moins de 35 heures de production (Fiehler *et al.*, 1997).

### Propriétés tensioactives

Les propriétés tensioactives des sophorolipides furent largement moins étudiées et de façon beaucoup moins spécifique que leur structure. Par conséquent, l'abaissement de la tension de surface de l'eau par les sophorolipides fut rarement rapporté. Une valeur de 33 mN/m fut mesurée par Cooper et Paddock (1984) et celle de 37 mN/m par Zhou et Kosaric (1995). Une valeur de CMC de 82 mg/l à pH 4 fut mesurée par Cooper et Paddock, mais un autre auteur (Hommel, 1990) rapporte une valeur de 60 mg/l. Enfin, Cooper et Paddock (1984) ont noté la capacité du mélange de biosurfactants à disperser une phase hydrophobe et à récupérer du bitume d'un sable bitumineux tout en spécifiant que selon leurs critères, les sophorolipides de *Candida bombicola* n'agissent pas comme émulsifiants et ne stabilisent pas de façon satisfaisante une solution de deux liquides immiscibles.

### Application des sophorolipides

Les débouchés entrevus pour les sophorolipides se concentrent sur les produits à haute valeur ajoutée comme les cosmétiques (Desai et Banat, 1997), les produits alimentaires (Fiechter, 1992) et les détergents (Fiehler, 1997). Une compagnie japonaise, Kao Co. Ltd., commercialise les sophorolipides pour des

lignes de cosmétiques comme Sofina, où ils agissent comme humectants (Desai et Banat, 1997). Après un procédé d'estérification, les sophorolipides sont intégrés dans les formulations de produits capillaires et de crèmes hydratantes (Desai et Banat, 1997).

Dans une analyse économique, Desphande et Daniels (1995) ont évalué le coût de production des sophorolipides à 2,69 US\$/kg et 3,60 US\$/kg (suivant deux méthodes différentes de calcul) dans un fermenteur de 200 000 litres. Mais ils évaluent que le prix des biosurfactants doit se transiger à moins de 2 US\$/kg pour être compétitifs aux surfactants synthétiques. Enfin, ils ont évalué le contenu nutritionnel de la biomasse produite et conclu qu'elle pourrait être vendue dans l'industrie de production de nourriture animale.

---

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Le chapitre présente une synthèse des protocoles poursuivis. La première partie s'attache à la production des biosurfactants. Les conditions de production en Erlenmeyer et en réacteur y sont présentées, suivies des méthodes d'analyse des paramètres de production. La seconde partie porte sur le lavage de sol et détaille les expériences réalisées pour évaluer le potentiel des biosurfactants pour cette technologie.*

## 2.1. DÉMARCHE GÉNÉRALE

Le plan de travail poursuivi au long des travaux est illustré à la figure 2.1. Il présente les étapes expérimentales de la recherche, qui ont également demandé une attention particulière pour le développement de techniques analytiques relatives au suivi de la production de sophorolipides.

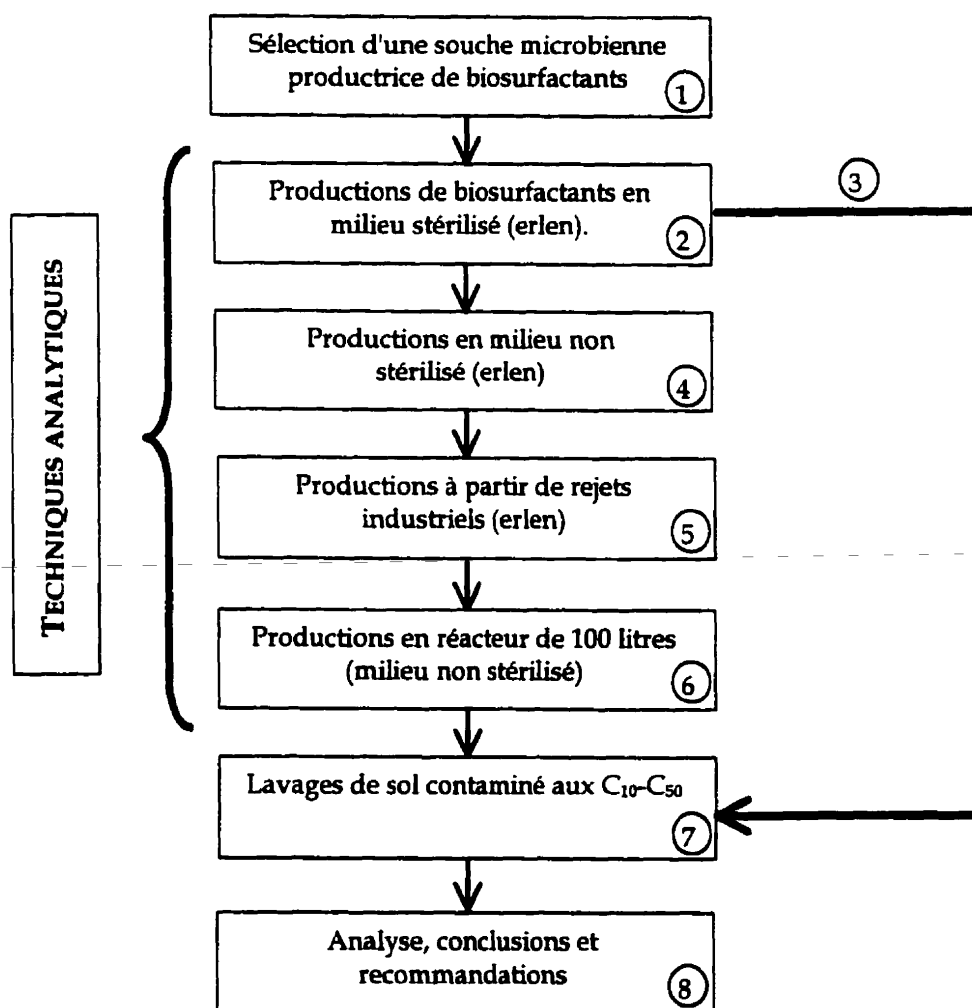


Figure 2.1 Plan de travail



## **2.2. PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES (BIOSURFACTANTS)**

---

Parmi les travaux consultés, les résultats publiés par Zhou et ses collaborateurs (1992, 1993 et 1995) fournissaient plusieurs indications sur le protocole de production. Ainsi, ils ont publié suffisamment d'informations pour bien cerner les conditions et facteurs d'influence lors de la production. Ensuite, les substrats évalués dans leurs travaux, à savoir le glucose et différentes huiles végétales de grade alimentaire, pouvaient facilement être retrouvés sous la même forme dans des rejets industriels, à l'inverse des esters qui donnent cependant de meilleurs rendements. Enfin, la production en mode cuvée est la plus simple à des fins d'étude de faisabilité et d'application en laboratoire. Les autres recherches publiées sur la production de sophorolipides par la levure (citées à la section 1.3.2 du chapitre 1) ont servi alors d'appui quant aux techniques analytiques, aux conditions de production en réacteur (pH, température, agitation) et à l'influence des substrats sur la production.

### **2.2.1. SÉLECTION D'UNE SOUCHE PRODUCTRICE DE BIOSURFACTANTS**

Tel que présenté au terme du premier chapitre, la revue des différentes recherches effectuées sur la production de biosurfactants a mené au choix de la levure *Candida bombicola* ATCC 22214 comme souche productrice. Ce choix fut motivé par sa forte productivité (en biosurfactants) en général, par son potentiel de production à partir de rejets industriels, par son habileté à baisser la tension de surface et enfin, en raison de l'acidité du milieu de production qui pourrait inhiber la croissance de bactéries opportunistes dans le milieu et éviter le recours à la stérilisation.

### **2.2.2. PROVENANCE ET MAINTIEN DE LA SOUCHE**

La souche microbienne fut obtenue directement de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD), sous l'identification *Candida bombicola* ATCC 22214. Après réhydratation, la souche fut maintenue à 4°C sur gélose YM (DIFCO Laboratories), constituée de 3g/l d'extrait de levure Bacto, de 3g/l d'extrait de malt (Difco), de 5g/l de peptone Bacto, de 10g/l de dextrose Bacto et de 20g/l d'agar Bacto. Elle fut par la suite transférée à chaque mois. Le protocole P3A, présenté en annexe A, présente des informations supplémentaires.

### **2.2.3. MILIEU DE PRODUCTION (d'après ZHOU et KOSARIC, 1995)**

Les besoins chimiques pour la croissance de la levure et la production de sophorolipides demandent la présence de sources de carbone, d'énergie, d'azote et de minéraux, ainsi que d'eau et de vitamines. Le milieu optimisé par Zhou et Kosaric (1995) fut sélectionné pour la présente recherche. Il se compose de 01g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1g/l  $\text{FeCl}_3$ , 0,1g/l  $\text{NaCl}$ , 4g/l d'extrait de levure, 1g/l d'urée, de 105g/l d'huile canola (grade alimentaire, sans agents de conservation) et de 100g/l de glucose. Le pH du milieu est ajusté à 4,5 avec de l'acide chlorhydrique.

Pour les productions à partir d'un milieu initialement stérile, le milieu est complété avec de l'eau distillée puis autoclavé durant 20 minutes à 121°C, 101,3kPa. Pour les productions en milieu non stérilisé, de l'eau courante est employée et le milieu est non autoclavé. L'huile de canola et le glucose sont les substrats dont la substitution par des rejets industriels est visée. La provenance des produits chimique est indiquée dans le protocole P3B, sous la section matériels, en annexe A.

## Température

La température optimale de croissance de la levure fut rapportée pour une plage de 22°C à 25°C (Spencer *et al.*, 1979). Certains auteurs ont vérifié l'influence de la température sur la croissance et la production et dans ces cas, la température optimale varie entre 25°C (Davila *et al.*, 1997) et 27°C (Desphande et Daniels, 1995). Ils n'ont cependant fait ces évaluations que pour une plage de température allant de 25°C à 37°C. Zhou et ses collaborateurs (1992, 1993 et 1995) ont réalisé leurs expériences à 30°C. Aucune des publications consultées ne rapporte de production à température ambiante.

Dans le but de simplifier le procédé, les expériences furent réalisées à température ambiante (21°C), en recouvrant les Erlenmeyer de papier d'aluminium pour minimiser la perte de chaleur dégagée par la respiration cellulaire.

## pH

Zhou et Kosaric (1995) n'ont pas ajusté le pH durant leurs essais, qui descendait rapidement de 4,5 à des valeurs de 3,2 - 3,4. Sous d'autres conditions, le pH descendait en quelques heures de 6,0 à 2,8 (Desphande et Daniels, 1995). Certains auteurs ont évalué un pH optimal de croissance et de production autour de 3,5 (Davila *et al.*, 1997 ; Desphande et Daniels, 1995) et 4,7 (Fiehler, 1997). Le fait d'ajuster le pH augmente le rendement de production d'environ 20% (97g/l à 120g/l) (Desphande et Daniels, 1995).

D'après ces informations, le pH ne fut pas ajusté, sauf au temps 0, où il fut ajusté à 4,5. Ceci évite l'emploi de produits chimiques supplémentaires.

#### **2.2.4. CONDITIONS DE PRODUCTION EN ERLENMEYER**

##### **Inoculum**

Deux colonies prélevées sur les géloses YM servaient à l'ensemencement d'un Erlenmeyer de 1 l à chicanes contenant 0,2 l de milieu de culture YM liquide stérile, ce milieu contenant 1% de glucose (10g/l). Après une croissance de 48 heures à température ambiante sous agitation de 200 rpm, un second Erlenmeyer de 1 l à chicanes contenant 0,3 l de milieu liquide stérile YM futensemencé avec 0,01 l de la première culture (3% v/v). Après 24 heures d'agitation à 200 rpm et température ambiante, 0,03 l de cette seconde culture servaient d'inoculum pour 0,3 l de milieu de production (10% v/v).

L'ajout de 10% de milieu YM au milieu de production implique que les concentrations initiales en glucose et en huile végétale sont de 9,1% et 9,5%, respectivement, pour le milieu total de production (les concentrations du milieu avant inoculation sont de 10% et 10,5%). Le protocole P3B en annexe A présente de façon détaillée la démarche.

Pour des productions de 1,6 l en erlemeyer de 6 l muni de chicanes, la procédure est identique, à l'exception de l'inoculum du milieu de production qui est de 0,16 l au lieu de 0,030 l.

### **2.2.5. CONDITIONS DE PRODUCTION EN RÉACTEUR**

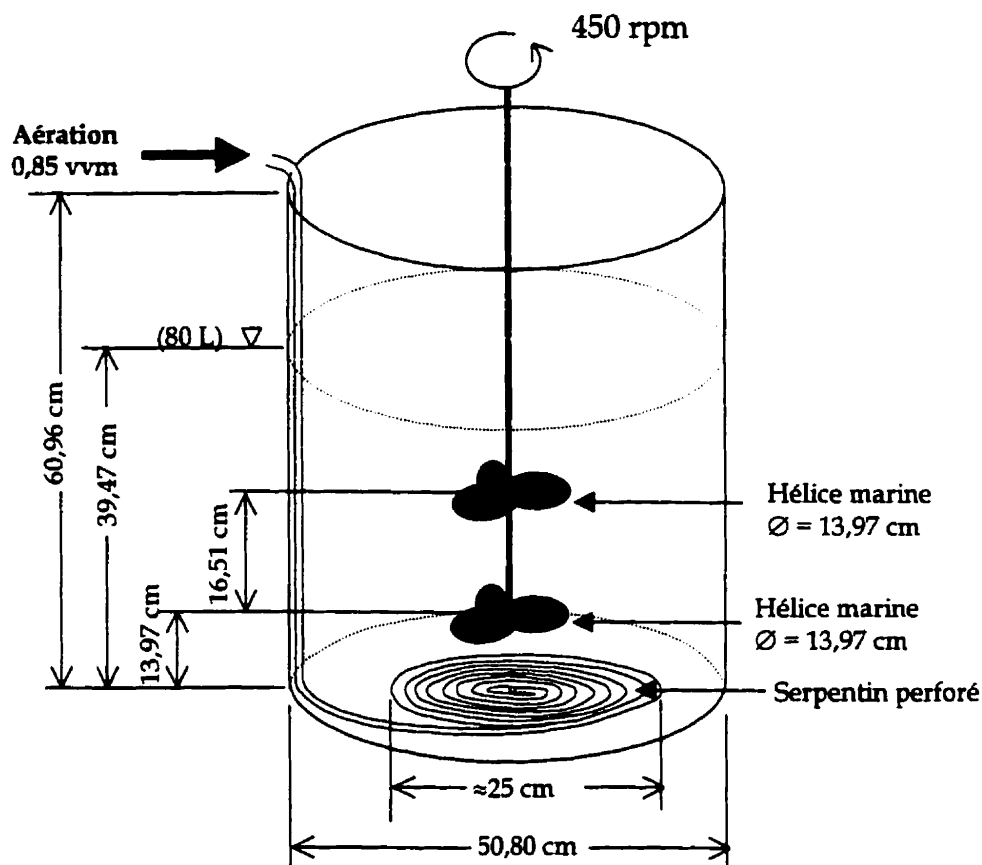
#### **Inoculum**

Deux colonies de *Candida bombicola* étaient prélevées et ensemencées dans 0,3 l de milieu YM (protocole P3A) stérile contenus dans un Erlenmeyer de 1 l à chicanes, puis incubés à température ambiante, à 200rpm pour 48 hrs. Deux cent quarante millilitres (0,24 l) de cette culture servirent ensuite d'inoculum pour 8 l de milieu YM stérile répartis dans quatre Erlenmeyer à chicane de 6 l chacun. Après 24 heures d'incubation à température ambiante à 200rpm, la totalité de cette culture servit d'inoculum à 72 litres de milieu de production en réacteur. L'évaluation de la persistance de la culture fut évaluée en conservant 8 litres de la fin de production précédente pour inoculer 72 litres d'un milieu de production frais (non stérile).

#### **Réacteur**

Le réacteur en acier inoxydable possédait un volume utile de 100 litres (diamètre interne de 50,8 cm), mais fut rempli à 80 litres de milieu de production, incluant l'inoculum. L'aération fut maintenue à 0,85 vvm et distribuée à l'aide d'un serpentín en PVC perforé, disposé au fond du réacteur. Deux hélices marines à deux pales (diamètre de 13,97 cm), disposées à 13,97 cm du fond et à 16,51 cm l'une de l'autre, assuraient l'agitation en poussant le liquide vers le haut (la viscosité du milieu le permettant), ce qui évitait l'accumulation d'huile végétale non émulsifiée sur le bord des parois en surface (zones mortes). La vitesse d'agitation était maintenue à 400 rpm (moteur de ¼ HP).

Un schéma du réacteur utilisé au laboratoire est présenté à la figure 2.2.



**Figure 2.2** Réacteur pour la production de sophorolipides

#### **2.2.6. TECHNIQUES ANALYTIQUES : SUIVI DE LA PRODUCTION**

La mise au point des techniques analytiques relatives au suivi de la production a nécessité plusieurs expériences. Pour chaque méthode présentée dans cette section, le numéro d'identification du protocole correspondant est indiqué entre parenthèse. Les lecteurs pourront s'y référer, en annexe A, pour plus de détails sur les équipements, la méthodologie et les produits chimiques. Ces

informations ne sont pas essentielles à la compréhension des expériences et de leurs résultats mais certaines précisions pertinentes et recommandations sur les méthodes, leurs limites et leurs applications sont fournies, accompagnées de figures et diagrammes. Les principaux éléments de ces techniques analytiques sont présentés ci-dessous.

#### 2.2.6.1 *Biomasse (protocole P3C)*

La masse cellulaire présente dans le milieu fut déterminée sur la base de son poids sec. Un échantillon de 10 ml de bouillon de production est prélevé, tout en maintenant l'agitation du milieu pour assurer un échantillonnage représentatif. Après centrifugation à 8500 rpm durant 20 minutes (21°C), le surnageant est récupéré pour d'autres analyses et 5 ml d'eau et 20 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés au culot qui est resuspendu et recentrifugé sous les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est conservé et ajouté au premier, tandis que le culot est récupéré et séché à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. L'erreur moyenne sur les mesures fut de 3%, le maximum pouvant aller jusqu'à 16% au premier jour de production (i.e. quand la concentration totale est de moins de 5 g/l).

#### 2.2.6.2 *Sophorolipides*

Les méthodes d'analyses des sophorolipides peuvent être complexes et demander des équipements spécialisés. Ainsi, l'usage de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) implique la mise au point d'une méthode très spécifique pour des composés peu usuels. Si cette méthode permet une identification certaine des sophorolipides, elle peut demander un temps de développement relativement long, d'autant plus que les sophorolipides ne sont

pas disponibles en tant que standards de calibration. Cependant, dans les travaux publiés sur la production de sophorolipides, d'autres techniques sont combinées à la chromatographie à haute performance et ces techniques visent la quantification des sophorolipides.

Deux méthodes de quantifications furent alors employées pour l'estimation de la production, soit la gravimétrie et la spectrophotométrie. Afin de confirmer l'identité des composés récupérés, une méthode d'identification relativement simple fut employée. Il s'agit de la chromatographie en couche mince. Cette méthode est assez spécifique pour permettre d'associer les composés produits aux sophorolipides, quoiqu'elle ne permette pas l'identification de chaque composé.

Les trois méthodes font appel à l'extraction préalable des sophorolipides à l'acétate d'éthyle. La tension de surface des sophorolipides purifiés fut mesurée afin de déterminer la concentration micellaire critique du mélange de sophorolipides.

### **Gravimétrie (protocole P3C)**

Après centrifugations et extraction de l'échantillon à l'acétate d'éthyle (pour la détermination de la masse de cellules), les surnageants récupérés forment deux phases. La phase légère (organique) est récupérée du tube à centrifuger à l'aide d'une pipette pasteur et la phase lourde (aqueuse) est réextraite 3 fois avec 20 ml d'acétate d'éthyle, la phase organique étant à chaque fois récupérée dans un ballon à fond rond. La phase organique est ensuite évaporée à 70°C-80°C sur un roto-évaporateur opérant sous vide. Le résidu (sophorolipides) est lavé à l'hexane, pour retirer les acides gras, séché puis pesé jusqu'à l'obtention d'un



poids constant. L'erreur moyenne sur les extractions et les résidus récupérés fut de 4% et constante (erreur maximale observée de 5,2%).

### **Spectrophotométrie (protocole P3E)**

Les sophorolipides peuvent être évalués par analyses des sucres de la phase organique suivant les extractions du milieu de production (Desphande et Daniels, 1995). La méthode se base sur les informations structurales connues sur les sophorolipides (voir la figure 1.12 du chapitre 1). Avec le glucose comme standard (Desphande et Daniels, 1995), le contenu en sophorolipides peut être estimé en assumant que 1 gramme de glucose dans la phase organique correspond à 1,91 g de sophorolipides (Asmer *et al.*, 1988). La méthode colorimétrique au phénol (Dubois *et al.*, 1956) fut employée pour l'analyse d'un échantillon de phase organique récupérée.

### **Chromatographie en couche mince (protocole P3F)**

L'analyse qualitative des sophorolipides fut réalisée en chromatographie en couche mince (TLC) selon les spécifications d'Asmer et ses collaborateurs (1988). 5 à 15 µl du milieu de production extrait à l'acétate d'éthyle furent appliqués sur des plaques de 20cm x 20cm x 1cm en gel de silice. Le solvant à développement était composé de chloroforme/méthanol/eau (65:15:2). Le réactif à détection se composait d'un mélange d'anisaldéhyde/acide sulfurique/acide acétique (0,5:1:50). Plusieurs standards internes furent testés : cholestérol, acétate de cholestérol, 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, 11 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, cortisone et galactocérébroside.

### **Mesure de la tension de surface et de la CMC (protocole P3G)**

Les mesures de tension de surface furent réalisées avec un tensiomètre fonctionnant avec un anneau de platine, qui représente la méthode de l'anneau du Nouy (Fisher Scientific Ltd, modèle 21, Tensiomat semi-automatique). Les sophorolipides récupérés après extractions à l'acétate d'éthyle et lavage à l'hexane ont été séchés et passés au mortier. Une quantité connue de ces sophorolipides (sous forme de poudre) fut diluée dans un volume connu d'eau distillée puis solubilisée dans un bain à ultrasons. Cette solution fut par la suite diluée et la tension de surface mesurée pour plusieurs concentrations. Le tensiomètre fut calibré avec de l'eau distillée, pour laquelle la mesure de tension de surface était de 77,8 dynes/cm. L'obtention de trois mesures successives similaires était nécessaire avant de déterminer la tension de surface de la solution, qui est formée de la moyenne de ces trois mesures. La concentration micellaire critique (CMC) fut déterminée en traçant les valeurs de tension de surfaces mesurées en fonction des concentrations respectives de la solution.

#### **2.2.6.3 Huile végétale (protocole P3C)**

L'hexane ayant servi au lavage des sophorolipides après évaporation de l'acétate d'éthyle est récupéré dans une fiole préalablement pesée. Le mélange est ensuite évaporé puis pesé jusqu'à poids constant. L'erreur sur les mesures d'huile végétale récupérée furent de 10% pour les premiers jours (1 à 4) de production, pour être de moins de 5% les jours suivants.

#### 2.2.6.4 Glucose (protocole P3D)

La concentration en glucose dans le milieu de production est estimée à l'aide de l'analyse de la phase aqueuse récupérée après les extractions à l'acétate d'éthyle. L'estimation suit la méthode colorimétrique au phénol (Dubois *et al.*, 1956), avec le glucose comme standard. Pour chaque échantillon, initial, trois analyses sont réalisées. L'erreur moyenne sur les mesures fut de 4% dans 95% des cas, l'erreur maximale étant de 10%.

#### 2.2.6.5 Rendement

Le rendement en sophorolipides fut défini par Davila et ses collaborateurs (1994) comme le ratio de la masse de sophorolipides produite (g) sur la masse de glucose et de substrat lipidique consommé (g) durant une période de production donnée. La même définition fut employée dans cette recherche.

#### 2.2.6.6 Vérification de la pureté microbiologique du milieu non stérile (protocole P3H)

Pour vérifier s'il y a eut croissance de micro-organismes opportunistes autres que *Candida bombicola* durant les productions en milieux non stérilisés, des décomptes microbiens sur milieux sélectifs furent réalisés en début et en fin de production. Deux types de géloses furent employés, soit un favorisant la croissance des hétérotrophes totaux et un favorisant la croissance des levures. 100µl de bouillon de production étaient dilués dans de l'eau saline stérile à diverses concentrations pour permettre les décomptes. Après incubation, les unités formant des colonies furent répertoriées, suivant leur groupe et leur apparence. Les différentes colonies étaient ensuite observées au microscope pour mieux les caractériser.

## **2.3. LAVAGE DE SOL**

---

### **2.3.1. SOL À L'ÉTUDE**

Dans les premières étapes du plan de travail, il était opportun de tester l'habileté de la solution brute à laver un sol contaminé avant de concentrer les efforts sur les techniques analytiques en développement. Le potentiel de lavage du bouillon brut de production de sophorolipides fut évalué pour un sable grossier ( $1\text{mm} < \varnothing_{\text{particules}} < 4,75\text{mm}$ ) contaminé à 13 000 mg/kg de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. Après ces essais préliminaires, un sable de granulométrie plus fine mais de contamination similaire fut employé. Ce sont les caractéristiques de ce sol qui sont présentées ci-dessous.

#### **2.3.1.1 Granulométrie**

Le sol initial, dont la courbe granulométrique est présentée à l'annexe B fut séché, broyé et tamisé à 1mm. Après tamisage, 95% des particules ont un diamètre entre 0,08mm et 1mm. Le sol est donc un sable de granulométrie fine à moyenne, selon les classifications de l'American Society for Testing & Materials, contenant très peu de fines (argile et limon). Le sol contient peu de matière organique.

#### **2.3.1.2 Contamination**

La contamination du sol en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> a pris son origine dans un site de raffinerie. La concentration en contaminants sur la fraction tamisée du sol est de 13 400 mg/kg de sol sec. La contamination se répartit sur toutes les plages

d'hydrocarbures, ainsi que le présente le tableau 2.1. Les analyses furent réalisées à l'extérieur (Novamann Maxxam, Lachine), selon la méthode 410-HYD.1.0 du Ministère de l'environnement et de la faune (Annexe A).

**Tableau 2.1** Contamination du sol, par plage d'hydrocarbures

<i>Plage d'hydrocarbures</i>	<i>Concentration dans le sol (mg/kg sec)</i>
C <sub>10</sub> -C <sub>19</sub>	3 400
C <sub>20</sub> -C <sub>29</sub>	5 000
C <sub>30</sub> -C <sub>39</sub>	3 400
C <sub>40</sub> -C <sub>50</sub>	1 600
C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub>	13 400

### **2.3.2. CONDITIONS DE LAVAGE (protocole P3I)**

Les paramètres étudiés furent la concentration de la solution de lavage et la température de lavage (21°C et 50°C), en fonction de la concentration résiduelle en contaminants dans le sol lavé.

Les lavages ont été réalisés en mode cuvée dans des béciers de 0,6 l, chaque lavage étant réalisé en triplica. Après mélange du sol, 22 grammes étaient prélevés et déposés dans trois béciers et 0,125 l de solution de lavage y étaient ajoutés (15% p/v). Les solutions de lavage étaient préalablement amenées à la température de lavage. Un agitateur à quatre postes (Phipps & Bird) permettait de maintenir l'agitation à 150 rpm. Pour évaluer l'efficacité de lavage à 50°C, le montage était disposé dans un bain chauffant. Chaque lavage impliquait quatre cycles d'agitation de 30 minutes entrecoupés de 24 heures de décantation. Après chaque décantation, le surnageant était retiré et le même volume d'une solution fraîche rajouté pour le prochain cycle. Après la dernière décantation, le surnageant était retiré et l'échantillon de sol mélangé et envoyé pour analyse des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> résiduels. En général, l'écart-type observé entre les triplica fut de 530 mg/kg.

## CHAPITRE 3

### PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES

### - RÉSULTATS ET DISCUSSION -

*Une importante partie du projet fut consacrée à la production de sophorolipides, l'étape limitant le passage aux objectifs de lavage de sol. Ce chapitre présente résultats relatifs à la production de sophorolipides par Candida bombicola ATCC 22214, lesquelles ont été obtenues suite à la mise au point des techniques analytiques présentées au chapitre 2. Les résultats sont illustrés pour des productions "idéales", puis comparés à des productions où des milieux non stérilisés et des rejets industriels furent utilisés. Enfin, les résultats de production de 80 litres de solution de biosurfactants en réacteur sont présentés et discutés.*

### **3.1. PRODUCTIONS EN ERLENMEYER**

---

#### **3.1.1. MILIEU IDÉAL STÉRILE**

On entend par milieu idéal le milieu décrit par Zhou et Kosaric (1995), repris à la section 2.2.3 du chapitre précédent, dont les principaux substrats sont de l'huile de canola et du dextrose (glucose) purs. 1,6 l de ce milieu furent stérilisés avant inoculation avec une culture pure de *Candida bombicola* dans un Erlenmeyer de 6 l muni de chicanes. Un tel volume fut nécessaire pour réaliser un cycle complet de lavage de sol. Plusieurs productions furent réalisées pour la mise au point des techniques analytiques, et les premiers bouillons produits ont servi aux essais préliminaires de lavage de sol (ces résultats de lavage sont présentés au chapitre 4 suivant).

#### **Techniques analytiques et erreur expérimentale**

Les concentrations en biosurfactants (sophorolipides) ont été obtenues par gravimétrie. La méthode colorimétrique au phénol n'a pas permis d'obtenir des résultats concordants avec les valeurs gravimétriques et n'a pas été retenue pour l'analyse quantitative des biosurfactants. La présence de groupes acétylés sur les sophoroses semble entraver l'hydrolyse complète des molécules et la quantification par mesure du glucose. Toutefois, la colorimétrie ne fut pas intensément évaluée ; ainsi la méthode de quantification à l'anthrone qui est mentionnée dans la littérature n'a pas été vérifiée et pourrait s'avérer plus appropriée. Pour plus de détails concernant les essais sur la méthode colorimétrique, leurs résultats sont présentés et discutés dans le protocole P3E, en Annexe A.

Les erreurs les plus significatives sur les mesures ont été observées aux premiers jours de production, là où les quantités en biomasse et en sophorolipides étaient faibles et l'huile végétale non émulsionnée, ce qui rendait un échantillonnage homogène difficile (deux phases en présence). Par ailleurs, la forte concentration en sophorolipides vers la fin de production changeait la rhéologie du milieu, qui était à ce moment plus dense, et nuisait à un échantillonnage représentatif. Cette difficulté d'échantillonnage après la période de croissance de la biomasse, où la concentration en sophorolipides s'élève considérablement, fut par ailleurs relevée par Davila et ses collaborateurs (1992) ainsi que Rau et ses collègues (1996). Des informations supplémentaires sur les analyses d'erreur expérimentale sur les extractions sont données dans le protocole P3C en Annexe A. Mais de façon générale, les erreurs les plus significatives sont dues à l'échantillonnage et non à la méthode analytique, et furent de l'ordre de 10% (écart-type ramené sur la moyenne de triplica).

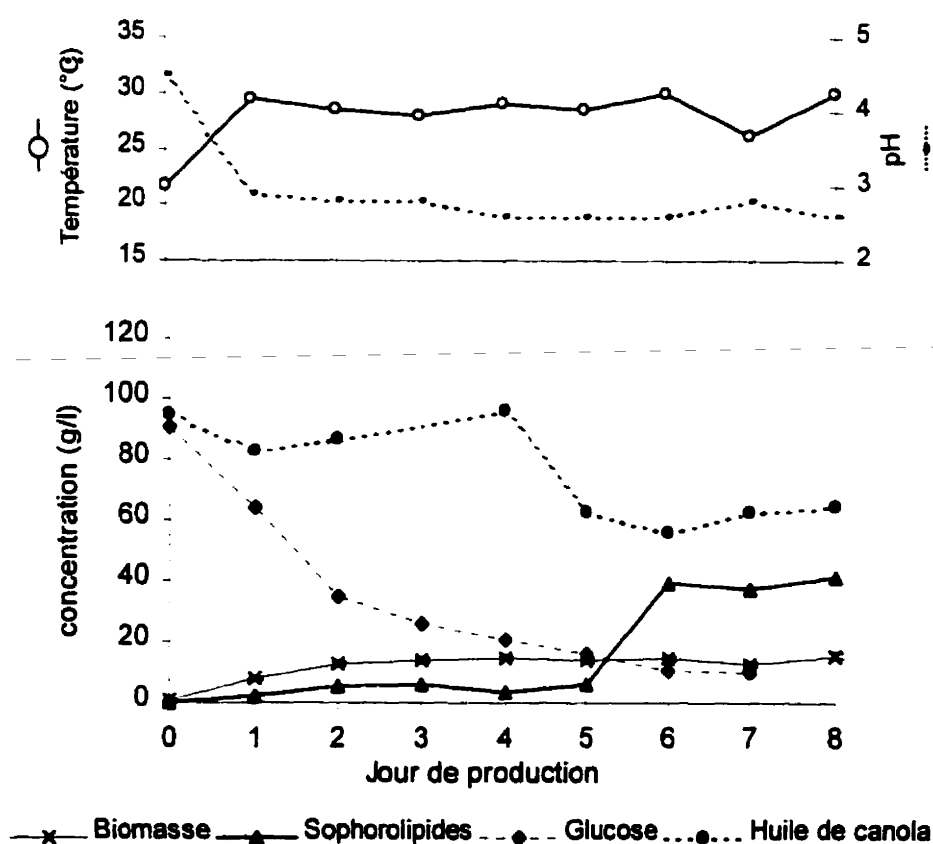
### **Suivi de la production**

La figure 3.1 présente le suivi des principaux paramètres de production, soit les productions de biomasse et de sophorolipides, ainsi que les consommations de glucose et d'huile de canola. L'évolution du pH du milieu et de la température y sont également présentés.

La figure 3.1 montre clairement que l'isolation des erlemeyers à l'aide de papier d'aluminium a favorisé le maintien d'une température propice à la croissance et à la production, qui se situe entre 25 et 30°C selon les études (voir la section 2.2.3 du chapitre précédent). En raison de l'activité microbienne (voir la courbe de croissance de biomasse) la température a augmenté immédiatement de 21°C



à un peu moins de 30°C, pour se maintenir à cette valeur tout au long de la production, sans avoir recours à aucun système externe de chauffage. La baisse de température observée au jour 7 est reliée à un arrêt imprévu de l'agitation qui a eu lieu entre le jour 6 et le jour 7. Cet arrêt est directement reflété sur les mesures de température, de pH, ainsi que sur les cinétiques de production et de consommation. En conséquence, entre le jour 6 et le jour 8 de production, il n'y a eu aucune évolution dans le milieu et il serait plus juste de parler d'une production de 45g/l de sophorolipides en six jours plutôt qu'en huit. Enfin, le pH du milieu descendit dès le début de la production de 4,5 à moins de 2,8, ce qui correspond aux données de la littérature mentionnées au chapitre précédent.



**Figure 3.1** Suivi de la production de sophorolipides par *Candida bombicola* en Erlenmeyer de 6 l dans un milieu stérilisé contenant 9,1% (p/v.) de glucose et 9,5% (p/v) d'huile de canola.

En observant la pente des courbes de disparition des substrats (i.e.  $dS/dt$ ), le glucose fut plus rapidement utilisé que l'huile végétale (fig.3.1), jusqu'à une concentration dans le milieu d'environ 10 g/l de glucose au jour 6. La consommation d'huile végétale par les micro-organismes n'a débuté que lorsque le glucose eût presque atteint sa concentration finale, entre le quatrième jour et le cinquième jour de production. L'huile fut à ce moment utilisée rapidement, comme le montre l'accentuation de la pente, jusqu'à une concentration d'un peu plus de 60g/l (jour 6).

La concentration en biomasse a atteint près de 15g/l après 3 jours de production et demeura relativement constante jusqu'à son arrêt (jour 8). Une faible baisse est visible au jour 7 et confirme le manque d'oxygène engendré par l'arrêt de l'agitation entre les jours 6 et 7. La concentration maximale en biomasse fut deux fois moindre que celle observée par Zhou et Kosaric (1995) (31 g/l) et cette situation peut être attribuée à la mise à l'échelle, leurs expériences ayant été réalisées en Erlenmeyer de 0,5 l sans chicanes.

Ainsi que le montre la figure 3.1, la production des sophorolipides a débuté dès le début de la production mais la majorité fut produite durant la phase stationnaire de croissance de la levure, ce qui répond à une cinétique de production non associée à la croissance. L'accumulation la plus importante de sophorolipides dans le milieu a concordé avec le début de la consommation d'huile végétale. Ainsi, tel qu'avancé par Davila et ses collaborateurs (1992), la biomasse serait principalement produite à partir du glucose, puisque le taux de consommation de glucose est directement relié au taux de croissance alors que le taux de production des sophorolipides augmente suite à l'augmentation de la consommation de la deuxième source de carbone. Le fait que ces deux derniers

ne soient pas directement reliés (comme le glucose et la biomasse) suggère fortement que la synthèse des sophorolipides est un processus enzymatique.

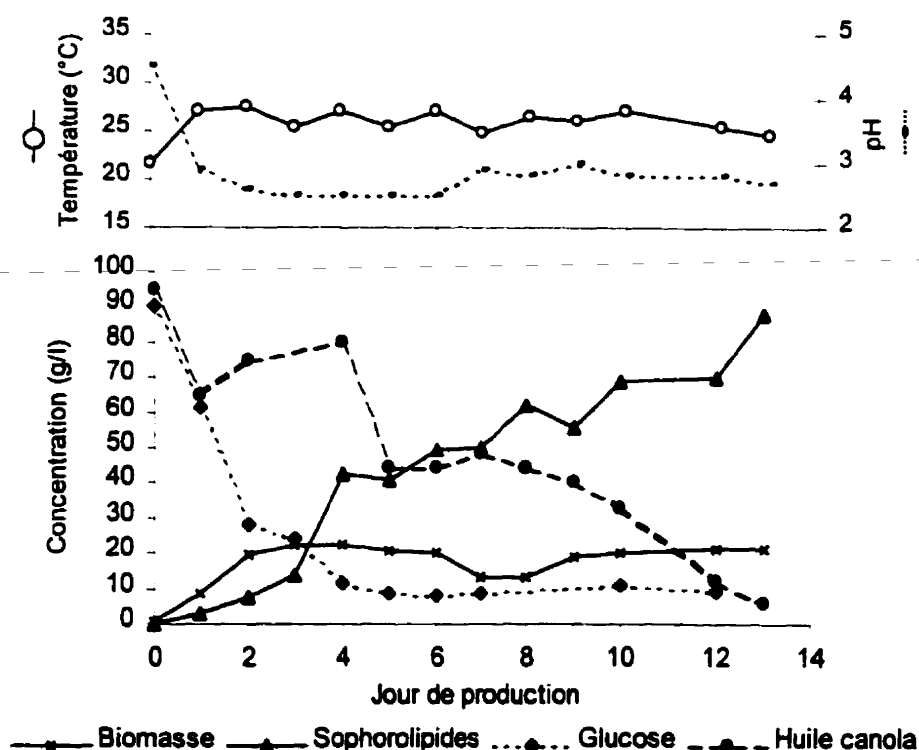
La concentration en sophorolipides atteinte après 6 jours de production fut pour ce type de production, de 45g/l, pour un rendement de 0,39g/g par rapport aux deux substrats. Cette valeur se compare aux données de la littérature, où on présente entre autres des rendements en sophorolipides de 0,39 et 0,43 g/g pour des productions de 7 jours à partir d'huile de palme et d'huile de tournesol, respectivement (Davila *et al.*, 1994).

D'après la figure 3.1, il est clair que si la croissance de biomasse intervient rapidement, la consommation de l'huile végétale et l'accumulation des sophorolipides n'a débuté qu'après 5 jours de production, ce qui est relativement long. D'autant plus que la concentration en sophorolipides obtenue après six jours ne fut que de 45g/l, comparativement à plus de 120g/l obtenus par Zhou et Kosaric (1995). Ceci est probablement relié à la nature de l'inoculant employé. En effet, ces chercheurs ont utilisé un milieu de culture identique au milieu de production, ce qui permet aux micro-organismes de s'acclimater à la présence du substrat hydrophobe et de réduire la phase de latence avant son utilisation, enclenchant l'accumulation des sophorolipides plus rapidement. Dans la présente recherche, la culture servant d'inoculant fut à base de glucose seulement, c'est pourquoi la période d'acclimatation des micro-organismes envers l'huile végétale fut observée durant la production. Enfin, le fait d'employer des Erlenmeyer de 6 l plutôt que des erlemeyers de moins d'un litre, même s'ils sont munis de chicanes, limite la diffusion d'oxygène, qui serait un élément majeur pour la production des sophorolipides (Desphande et Daniels, 1995). Il faut rappeler que l'usage de ces Erlenmeyer ne

fut destiné qu'à produire des volumes suffisants pour des essais préliminaires de lavage de sol à des fins d'étude de faisabilité ; l'optimisation de la production ne constituait pas un objectif au cours de cet essai. Ainsi, une production de 45g/l de biosurfactants dans ces conditions fut considérée prometteuse en regard des rendements obtenus pour des cultures bactériennes (de l'ordre de moins de 10g/l).

### 3.1.2. MILIEU IDÉAL NON STÉRILE

La production en milieu non stérilisé fut réalisée sous les mêmes conditions et en parallèle de la production en milieu "idéal" stérilisé précédente. Par contre, le volume de production fut de 0,3 l en Erlenmeyer de 1 l à chicanes et la production fut poursuivie durant 13 jours (figure 3.2).



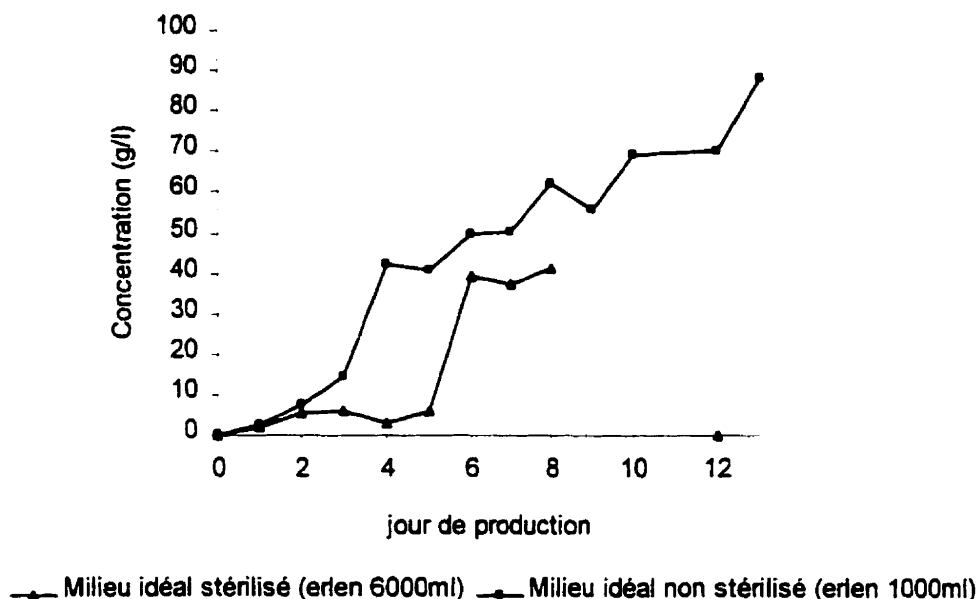
**Figure 3.2** Suivi de la production en Erlenmeyer d'un litre à partir d'un milieu non stérilisé contenant 9,1% de glucose pur et 9,5% d'huile de canola pure.

De façon générale, on observe la similarité avec la production en milieu stérilisé (fig. 3.1). La température fut moins constante et en moyenne un peu inférieure, pour se situer à 26°C, mais demeura dans la plage optimale de 25°C à 30°C pour la production et la croissance. L'arrêt de l'agitation entre le jour 6 et le jour 7 semble avoir eu un impact un peu plus prononcé sur les cellules que lors de la production en Erlenmeyer de 6000ml : celle-là ne revint à sa concentration maximale qu'au jour 9, en passant de 15 g/l à 20 g/l. Par contre, il n'y eût pas d'effet marqué sur le pH du milieu, qui se maintint toujours en-deçà de 3.

Du côté de la consommation des substrats, on remarque la variabilité des mesures d'huile végétale en début de production, causée par des difficultés d'échantillonnage. De façon générale, la consommation d'huile végétale fut immédiatement suivie d'une augmentation du taux de production de sophorolipides (pente de la courbe). Le glucose fut consommé relativement rapidement, pour atteindre une valeur limite de 10g/l dès le cinquième jour de production, après quoi seule l'huile végétale fut consommée. Étant donné que la masse cellulaire s'est maintenue à une valeur de 20g/l jusqu'au jour 13, on peut supposer que l'huile végétale sert aussi, mais dans une moindre mesure, de substrat de croissance et que la production de sophorolipides est liée à la présence d'enzymes sécrétées en présence d'huile végétale.

Le taux de production de sophorolipides fut plus élevé au départ pour les expériences en Erlenmeyer de 1 l, puisque la concentration atteinte était supérieure à 40 g/l après quatre jours de production (fig. 3.3). De plus, la production fut plus constante qu'en Erlenmeyer de 6 l, où elle avait augmenté brusquement (productivité plus élevée) du jour 5 au jour 6. La production de sophorolipides augmenta ainsi graduellement jusqu'à une concentration de

près de 90g/l après 13 jours de production pour un rendement de 0,52g/g par rapport aux substrats.



**Figure 3.3** Comparaison des productions de sophorolipides en milieu idéal stérilisé (1600ml de milieu) et non stérilisé (300ml de milieu) avant inoculation avec *Candida bombicola*.

Puisque les conditions de productions étaient différentes en terme de volume, il est juste d'attribuer le meilleur rendement de la levure à la mise à l'échelle. En effet, même si le ratio volume de liquide:volume de l'Erlenmeyer et les proportions dimensionnelles furent identiques, l'effet du poids du liquide dans les Erlenmeyer jouait un rôle lors de son déplacement au cours de l'agitation. Ainsi, le contenu des Erlenmeyer de 6 l se contentait de tourner au rythme de l'agitateur, tandis que dans les Erlenmeyer plus petits, une forte agitation était créée par les chicanes. C'est pourquoi le plus faible rendement est vraisemblablement attribuable à une agitation insuffisante et liée au transfert

d'oxygène. De plus, en observant la figure 3.3, on peut également présumer que si la production en Erlenmeyer de 6 l fut poursuivie au-delà de 8 jours, la production de sophorolipides serait comparable dans les deux cas, puisque seul un écart de 10g/l à 20g/l existe à partir du sixième jour.

Enfin, la conclusion la plus importante fut que l'utilisation d'un milieu de production non stérilisé, formulé à partir d'eau courante et sur lequel aucune mesure particulière pour éviter une contamination ne fut prise, n'a pas eu d'effet majeur d'inhibition sur la production de sophorolipides. Par conséquent, le passage au remplacement de certains substrats par des rejets industriels ne fut pas écarté.

### **3.1.3. PRODUCTION À PARTIR DE REJETS INDUSTRIELS**

À la suite des résultats en Erlenmeyer, la production de biosurfactants à partir de deux rejets industriels en milieu non stérilisé fut étudiée. La nature des rejets et leur accessibilité furent les principaux facteurs considérés pour leur sélection. Des productions parallèles permettant d'évaluer l'impact de chacun d'eux sur la production de sophorolipides furent complétées.

#### **3.1.3.1 Choix des rejets**

Les substrats évalués devaient constituer un sous-produit de l'industrie agro-alimentaire pour être considéré dans la présente étude. Les rejets recherchés devaient pouvoir constituer une source hydrophile riche en hydrates de carbone et une source hydrophobe riche en acides gras. Enfin, chacun de ces rejets devait être disponible en quantités suffisantes, à coût minimal et dans un même rayon de distance. Ce dernier critère visait à minimiser les coûts de

transport pour amener ces rejets à un site éventuel de production de biosurfactants et de lavage de sol.

La sélection des rejets fut entreprise par une inscription à la Bourse québécoise des matières secondaires (Société québécoise de récupération et de recyclage, Québec), dont l'objectif est de fournir un outil de gestion pour la valorisation des matières secondaires d'origine industrielle, municipale, commerciale et institutionnelle. Son rôle est de favoriser la transaction de matières entre producteurs et utilisateurs. Cette démarche a donc permis d'amorcer les contacts avec diverses entreprises et récupérateurs pour finalement sélectionner de la mélasse non raffinée et de l'huile végétale usée générés dans la région de Montréal (Qué).

#### **Source hydrophile riche en hydrates de carbone**

Lors du procédé de raffinage du sucre et de ses produits dérivés (sucrose, sucre inverti), un rejet de production non cristallisable se présentant sous forme de sirupeuse est généré. Il s'agit de mélasse sous forme non raffinée, de qualité et de composition variable. Chez *Sucre Lantic Ltée.* (Montréal), ce sous-produit est vendu pour raffinage et incorporation dans la nourriture pour animaux, de même que pour favoriser la croissance de levures. Selon les données mensuelles sur sa composition, le rejet comprend en moyenne 50% de sucres totaux (tableau 3.1). Elle se vend à environs 112\$ CDN la tonne métrique, ce qui revient à 0,112\$/kg, comparativement à 1,015\$/kg pour le sucrose. À titre comparatif, la mélasse raffinée composée à 72% de sucres totaux se vend



présentement à 0,65\$/kg, tandis que la mélasse raffinée composée à 55% de sucres totaux se vend à 0,40\$/kg à échelle industrielle<sup>1</sup>.

**Tableau 3.1** Composition moyenne de la mélasse non raffinée de *Sucre Lantic Ltée.* (données fournies par la compagnie, à titre indicatif seulement).

<i>Composant</i>	<i>Pourcentage</i>
Saccharose	40,14
Sucre inverti	11,88
Cendres	6,99
Organiques non sucres	18,61
Eau	22,38
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

Par ailleurs, le contenu en sucres des échantillons de mélasse employés fut analysé par colorimétrie avec le glucose pur comme standard. Les résultats ont montré une concentration de 52% en sucres dans la mélasse, ce qui concorde avec les données fournies par la compagnie (tableau 3.1). Cette concentration en sucres de la mélasse fut par la suite employée pour calculer la concentration équivalente de mélasse nécessaire à ajouter au milieu en remplacement du glucose pur.

Outre son contenu glucidique, la mélasse est susceptible de contenir plusieurs autres composés ; dans le cas présent, c'est son contenu en azote qui se montre intéressant. Il faut rappeler que l'azote est un élément clé pour la synthèse des sophorolipides, qui aura lieu pour une plage de concentration restreinte en azote et en conditions limitantes (revoir la section 1.3.2 du chapitre 1). De plus,

<sup>1</sup> Source: *Aliments Grand'ma*

il fut démontré que si l'extrait de levure (source d'azote et de vitamines) est nécessaire en concentration minimale (pour apporter environs 1/3 du contenu total en azote), la proportion manquante d'azote peut être apportée par d'autres sources et une variété de formes azotées est favorable, comparativement à de l'extrait de levure employé seul (Zhou *et al.*, 1992). C'est pour cette raison que le milieu idéal est formé d'une combinaison d'extrait de levure et d'urée.

Le contenu en azote de l'urée est relié à sa formule chimique ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ). Elle apporte 470mg/l d'azote au milieu de production qui contient 1000mg urée/litre de milieu (tableau 3.2). La mélasse non raffinée et l'extrait de levure employés au cours des expériences furent analysés pour leur contenu en azote ammoniacal et en azote Kjeldahl (total) (tableau 3.2).

**Tableau 3.2** Apport en azote de l'extrait de levure, de l'urée et de la mélasse non raffinée.

Composé	Contenu en $\text{N-NH}_4$ (mg/100g)	Contenu en N-tot (mg/100g)	Apport en azote total dans le milieu (mg/l)
Extrait de levure	683	2 514	101
Urée	-	47 000	470
Mélasse non raffinée	58	205	394 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> En assumant 52g glucose/100g mélasse, pour une concentration à 10% en glucose dans le milieu avant inoculation.

Sur la foi de ces analyses, il fut donc décidé de supprimer l'urée pour les productions où de la mélasse non raffinée était employée, puisque l'apport en azote total provenant de celle-ci est à 100mg près équivalent. Des essais en Erlenmeyer de 1 l où seul le glucose fut remplacé par la mélasse (résultats non montrés) ont par ailleurs montré des productivités en biosurfactants relativement faibles (moins de 10g/l), alors que les mêmes expériences en absence d'urée ont donné des rendements de beaucoup supérieurs (plus de

70g/l), ce qui laisse supposer que la présence d'azote dans la mélasse est bien un facteur d'importance dans la formulation du milieu.

### **Source lipophile riche en acides gras polyinsaturés**

Ainsi que mentionné au chapitre 1, une équipe de chercheurs s'est penchée sur l'influence du précurseur lipidique sur la production de sophorolipides et la structure du mélange de sophorolipides produits (Davila *et al.*, 1994). D'une part, leurs résultats ont montré que la proportion de formes acides des sophorolipides (les plus solubles) par rapport aux formes lactones (toujours prédominantes) augmentait lorsque le cosubstrat hydrophobe est principalement composé d'acides gras polyinsaturés. D'autre part, ils ont montré que la productivité de la levure est meilleure lorsque le cosubstrat est un ester ou une huile riche en acides gras C18:1 et C18:0.

Ces résultats ont aidé à la sélection d'un rejet industriel à base de gras. Parmi les rejets disponibles se trouvaient de la graisse animale, des mélanges d'huiles ayant servi dans l'industrie de la restauration, ainsi que de l'huile végétale provenant de l'industrie des croustilles et aliments similaires. Le premier fut écarté en raison de la forme solide qui y est associée (implique une étape de chauffage dans le procédé) et en raison des acides gras saturés qui le composent. Le second fut écarté en raison des origines diverses des huiles récupérées et de la variabilité des mélanges, ainsi que du fait qu'il se présente fréquemment sous forme solide et nécessite une filtration pour retirer les nombreux résidus. Le troisième rejet par contre se montrait particulièrement intéressant pour plusieurs raisons. En effet, les industries produisant des croustilles sont généralement de taille imposante et les volumes de rejets générés suffisants pour répondre à des besoins de production de

sophorolipides. Par conséquent, il est possible de s'approvisionner d'une seule source et de minimiser la variabilité de la composition du rejet.

*Les Aliments Humpty Dumpty Ltée.* (Lachine) emploie de l'huile de canola pure, sans préservatifs, pour la friture de ses croustilles. Aucun produit chimique n'est ajouté. Actuellement, une partie de cette huile usée est vendue à des producteurs de savon (0,04\$/kg d'huile usée), mais d'autres débouchés sont toujours considérés. Environ 120 000 kg d'huile usée furent générés en 1997.

L'huile de canola est une huile végétale composée d'acides gras polyinsaturés dont 55% à 60% est de l'acide oléique (C18:1) (Koseoglu et Lucas, 1990). La composition de l'huile de canola pure est fournie au tableau 3.3.

**Tableau 3.3** Composition en acide gras de l'huile de canola pure.

<i>Acides gras (%)</i>								
C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:0	C20:0
4,5	0,3	1,5	55,8	22,7	12,5	0,5	0,5	0,2

SOURCE : (Malcomson *et al.*, 1996).

L'exposition de l'huile à de hautes températures (180°C-190°C) pour la friture des aliments la rend sujette à l'oxydation thermique, à l'hydrolyse et à la dégradation thermique en présence d'air et d'eau (Koseoglu et Lucas, 1990). Le fait que l'huile ait subi de telles réactions se montrait donc comme un facteur favorable à sa sélection, puisqu'elles entraînent l'augmentation des acides gras libres (Koseoglu et Lucas, 1990). En contrepartie, il est possible qu'une partie de cette huile soit plus difficile d'accès pour les micro-organismes, car son oxydation thermique entraîne aussi la formation de produits de décomposition non volatils, suite à la polymérisation des acides gras insaturés dans l'huile

chaude. Tout en considérant ces éléments, l'huile de canola ayant servi à la préparation des croustilles fut sélectionnée comme substrat hydrophobe pour la production de sophorolipides. Ce résidu se présente sous forme liquide, avec environs 20% de son contenu sous forme solide (petites particules). L'huile est de couleur ambrée.

### 3.1.3.2 *Influence des rejets sur la production de sophorolipides*

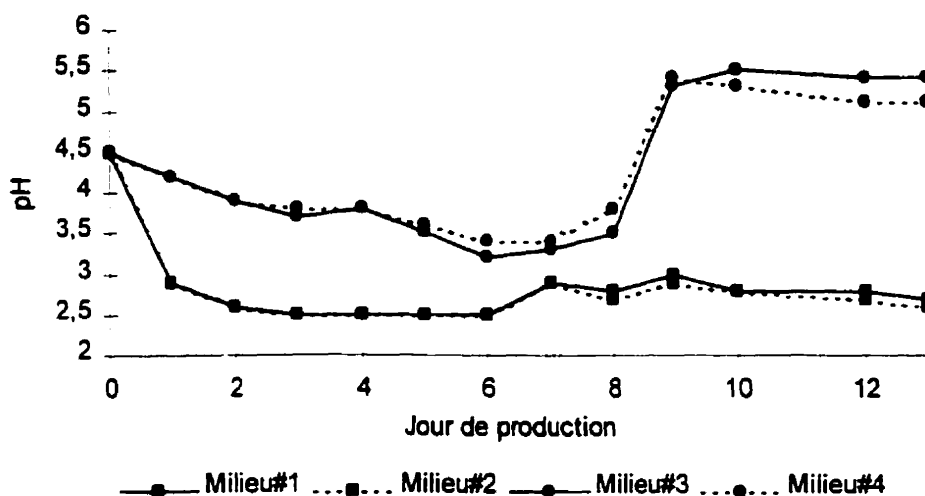
Quatre types de productions furent réalisées en parallèle afin d'évaluer l'influence de la substitution du glucose, de l'urée et de l'huile végétale par de la mélasse non raffinée et de l'huile végétale usée. Dans tous les cas, les inocula étaient identiques et provenaient de la même culture pure. Les milieux de production ont tous été complétés avec de l'eau courante et non stérilisés. Les mêmes proportions ont été conservées pour la formulation du milieu (i.e. 1g huile de canola pure = 1g huile de canola usée), et dans le cas de la mélasse, il fut assumé que 100g de mélasse équivalaient à 52g de glucose. Aucune préparation ou traitement supplémentaire (mis à part l'homogénéisation des échantillons) n'a été réalisé sur les rejets avant leur utilisation. Les essais ont été les suivants :

1. Milieu #1 : glucose + urée + huile végétale pure (milieu idéal);
2. Milieu #2 : glucose + urée + huile végétale usée;
3. Milieu #3 : mélasse + huile végétale pure;
4. Milieu #4 : mélasse + huile végétale usée.

Les comparaisons entre les pH et la température de production sont présentées aux figures 3.4 et 3.5, respectivement. Dans les figures, les différentes productions sont désignées par les milieux dans lesquels elles ont eu cours, suivant les descriptions ci-dessus.

La première constatation à l'examen de l'évolution du pH des milieux (fig. 3.4) fut que la mélasse (milieux #3 et #4) possède un fort pouvoir tampon. Ceci fut particulièrement évident lors de l'ajustement initial de pH, où la quantité d'acide (HCl) nécessaire pour amener le pH initial à 4,5 fut beaucoup plus importante dans les milieux #3 et #4 (contenant de la mélasse), que dans les milieux #1 et #2. Généralement, l'absence d'oxygène chez les levures se traduit par un passage en fermentation (changement de métabolisme) où la dégradation des substrats est incomplète et génère des sous-produits comme de l'acide lactique et de l'alcool (baisse temporaire du pH). Lorsque remises en présence d'oxygène, les levures reprennent leur respiration et métabolisent les acides organiques, ce qui fait remonter le pH. Ainsi, le pH des milieux contenant de la mélasse s'est maintenu au voisinage du pH optimal, soit entre 3,5 et 4,0, jusqu'au jour 8 de production. Mais à partir du jour huit, une augmentation du pH semblant répondre au manque d'oxygène entre les jours six et sept a eu lieu pour se maintenir à une valeur constante d'environ 5,5. Il est également possible que des micro-organismes étrangers présents uniquement dans la mélasse aient pris avantage du manque d'oxygène pour croître au détriment de la levure.

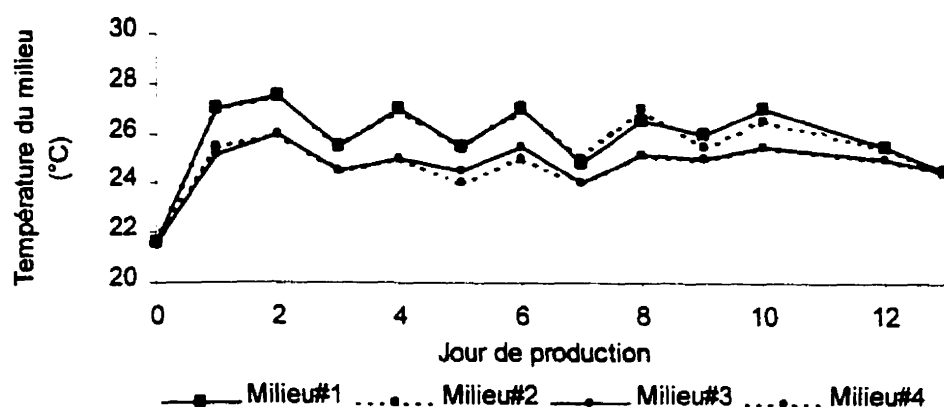
D'après l'examen des courbes de suivi de la figure 3.4, seule la présence de mélasse semble avoir une influence sur le pH du milieu, les milieux contenant de l'huile végétale usée (#2 et #4) se comportant comme les milieux contenant de l'huile végétale pure (#1 et #3).



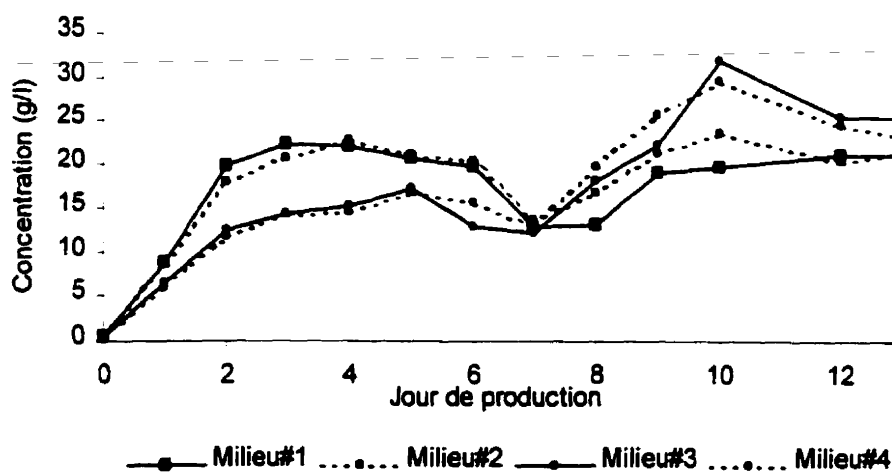
**Figure 3.4** Évolution du pH lors de la production de sophorolipides en Erlenmeyer d'un litre. Milieu#1=glucose+urée+huile de canola pure. Milieu#2=glucose+urée+huile de canola usée. Milieu#3=mélasse non raffinée + huile de canola pure. Milieu#4=mélasse non raffinée + huile de canola usée.

Le suivi des températures de production (fig. 3.5) est similaire à celui observé dans le milieu idéal précédent, quoique l'activité microbienne semble moins importante dans les milieux contenant de la mélasse que dans ceux contenant du glucose pur. Cette hypothèse est appuyée par les données de la figure 3.6 où la production de biomasse dans les différents milieux est illustrée. On remarque en effet que la masse cellulaire est moins importante dans les milieux contenant de la mélasse. L'effet du manque d'oxygène dans les milieux s'est clairement fait sentir sur la masse cellulaire (jour 7). Mais l'effet fut relativement moins important dans les milieux contenant de la mélasse (fig.3.6). Un autre élément particulier est à remarquer : alors que la biomasse des milieux contenant du glucose s'est remise à croître jusqu'au niveau précédent l'arrêt de l'agitation, la masse cellulaire des milieux contenant de la mélasse eût un taux

de croissance supérieur. Cette hausse concorde avec l'augmentation de pH observée à la figure 3.4 à partir du jour huit de production.



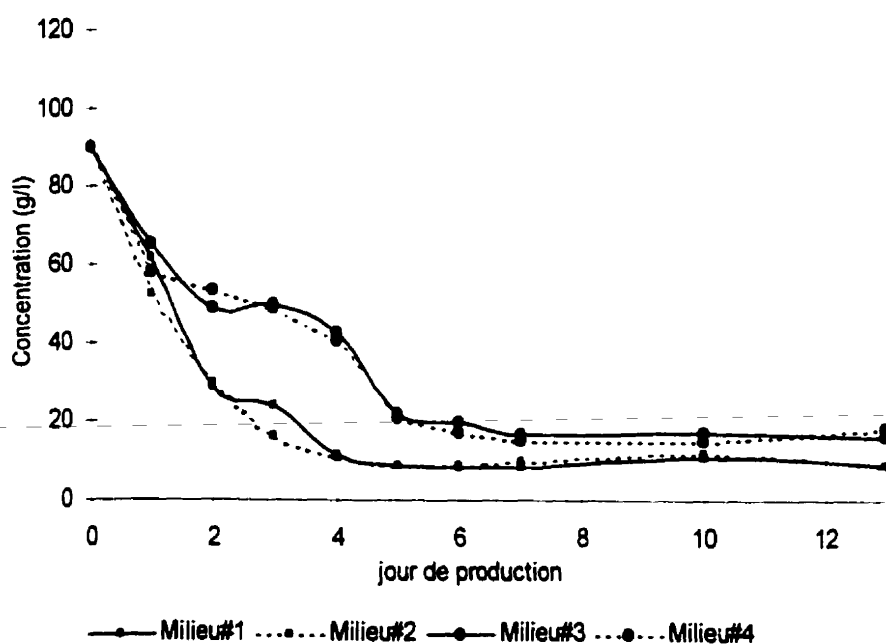
**Figure 3.5** Évolution de la température du milieu pour des productions en Erlenmeyer d'un litre. Les descriptions des milieux #1, #2, #3 et #4 sont identiques à celles données à la figure 3.4.



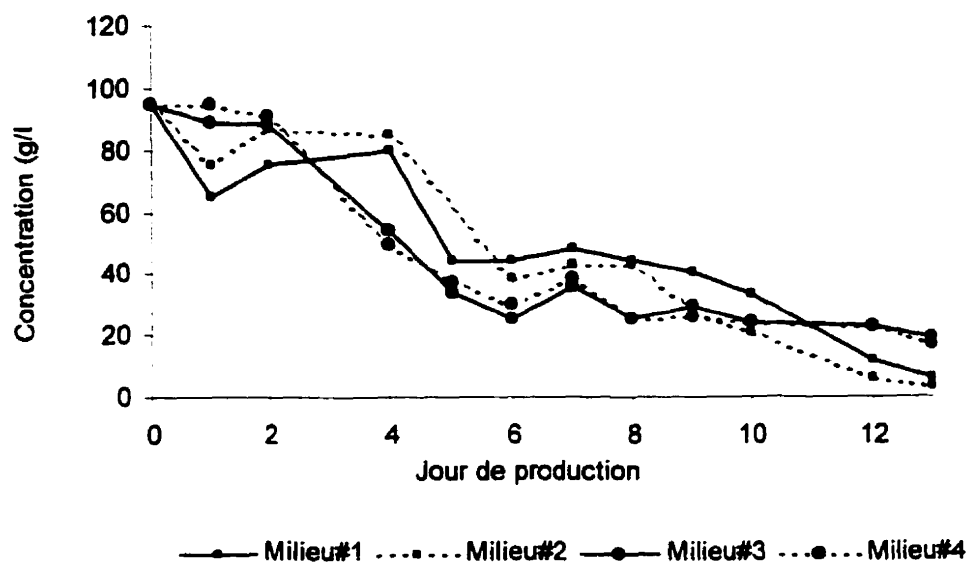
**Figure 3.6** Production de biomasse en Erlenmeyer d'un litre. Les descriptions des milieux #1, #2, #3 et #4 sont identiques à celles données à la figure 3.4.



La consommation des substrats est illustrée aux figures 3.7 et 3.8. Les hydrates de carbones présents dans la mélasse semblent moins accessibles que ceux du glucose pur (fig. 3.7) et la forme polymérisée des sucres présents dans la mélasse pourrait en être l'explication. En effet, le glucose fut beaucoup plus rapidement consommé (pente de la courbe plus prononcée) dans les milieux à base de glucose pur que dans les milieux à base de mélasse, ce qui expliquerait la masse cellulaire moins importante dans ces derniers (figure 3.6).



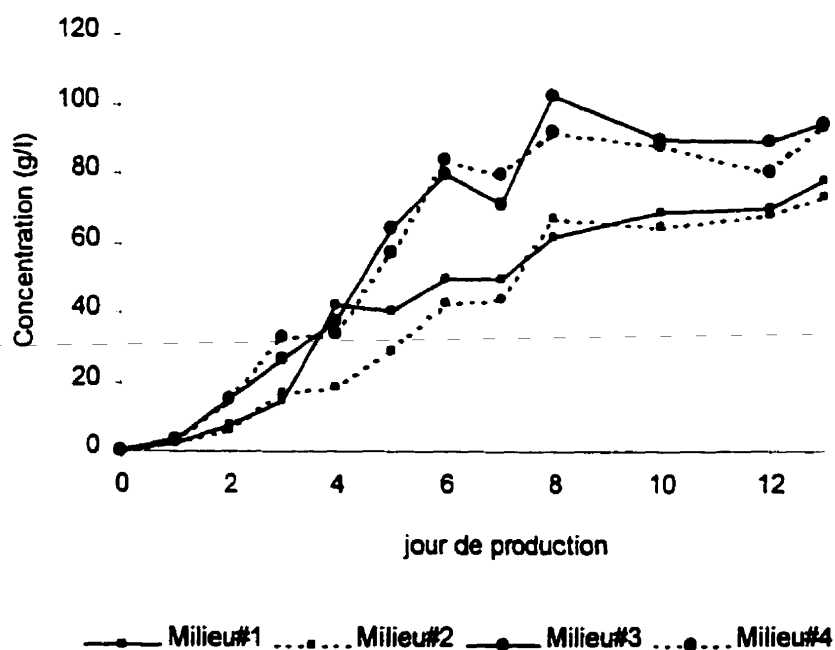
**Figure 3.7** Consommation de glucose lors de productions en erlenmeyers d'un litre (mélasse convertie en équivalent-glucose). Les descriptions des milieux #1, #2, #3 et #4 sont identiques à celles données à la figure 3.4.



**Figure 3.8** Consommation d'huile végétale lors de productions en erlemeyers d'un litre. Les descriptions des milieux #1, #2, #3 et #4 sont identiques à celles données à la figure 3.4.

La variabilité des mesures d'huile végétale en début de production (jour 0 à jour 3, figure 3.9) rend l'interprétation des résultats hasardeuse pour cette portion du graphique. À partir du jour 3, les mesures furent plus stables et en regard de d'une erreur expérimentale de 10% sur les mesures et de concentrations en biomasse similaires, l'huile fut consommée à un taux semblable dans tous les milieux. La nature de l'huile végétale ne semble pas avoir d'effet sur sa consommation. Par contre, il faut rappeler que la masse cellulaire était plus importante dans les milieux sans mélasse (#1 et #2) et que la consommation du substrat hydrophobe aurait dû y être supérieure dans ces milieux. Mais comme c'était l'influence au niveau de la production de sophorolipides qui fut le critère étudié, il fut conclu que la substitution des substrats purs par des rejets industriels n'a pas inhibé les cinétiques.

La comparaison des productions mesurées de sophorolipides dans les quatre milieux est présentée à la figure 3.9. Encore une fois, les milieux contenant de l'huile usée ceux contenant de l'huile pure se sont comportés de façon similaire. Ainsi, la différence la plus marquée est dans les milieux où la mélasse (#3 et #4 vs #1 et #2) entre en jeu plutôt que dans les milieux où l'huile végétale (#1 et #3 vs #2 et #4) intervient. Ceci pourrait être relié à l'effet tampon de la mélasse, qui a permis de maintenir le pH à des valeurs plus près de l'optimum (3,5-4,0). Desphande et Daniels (1995) ont en effet montré que la productivité en terme de sophorolipides est meilleure (environ 20%) lorsque le pH est contrôlé à 3,4 que lorsque le pH est non contrôlé et descend à des valeurs de 2,8.



**Figure 3.9** Production de sophorolipides en Erlenmeyer d'un litre. Les descriptions des milieux #1, #2, #3 et #4 sont identiques à celles données à la figure 3.4.

Toujours quant à la production de sophorolipides, la différence entre les productions est plus marquée entre les jours 5 et 8, après lequel il semble y avoir un plateau. Comme à partir du jour 8, la consommation de substrats était faible ou nulle (figures 3.7 et 3.8), il est normal de voir une faible production au-delà de ce jour. Enfin, les rendements par rapport aux substrats (huile + glucose) ont été de 0,46g/g, 0,43g/g, 0,63g/g et 0,63g/g pour les milieux #1, #2, #3 et #4, respectivement.

### **Chromatographie en couche mince**

Afin de confirmer la présence et l'identité des sophorolipides dans les échantillons extraits, une partie de ceux-ci était conservée pour analyse chromatographique en couche mince. La figure 3.10a montre une photocopie d'une plaque chromatographique où les échantillons du jour 7 de production ont été appliqués. La figure 3.10b montre les résultats publiés par Asmer et ses collaborateurs (1988). Aucun échantillon ne fut appliqué sur les bandes #1 et #2. La troisième bande de la figure 3.10a résulte d'un échantillon provenant d'une production stérile à partir de glucose, d'urée et d'huile de canola pure. La quatrième bande représente le même milieu de production, mais en milieu non stérilisé (milieu#1). La cinquième bande révèle les spots provenant d'un milieu où l'huile végétale fut remplacée par de l'huile usée (milieu#2). La sixième bande révèle un spot d'huile de canola pure, qui provient d'un échantillon au jour 0 (témoin), et la septième montre que le glucose (polaire) n'est pas révélé sur la plaque (non polaire). Les deux dernières bandes révèlent les spots pour des échantillons provenant des milieux #3 (mélasse + huile pure) et #4 (mélasse + huile usée), respectivement. En comparant avec le témoin, on voit que les spots pour les échantillons identifient des produits synthétisés durant la production puisqu'ils n'apparaissent pas sur le témoin. Les spots d'huile

végétale (sorte de "M" écrasé en haut de la bande) sont présents dans tous les échantillons, puisque ceux-ci proviennent de la phase organique extraite où l'huile ne fut pas encore retirée (revoir le chapitre 2 pour la méthodologie). Les bandes chromatographiques ont toutes révélé des spots similaires, ce qui laisse croire que les composés synthétisés dans tous les milieux le sont aussi, peu importe les substrats employés. La comparaison des spots de la plaque (fig.3.10a) avec les données de la figure 3.10b a permis de conclure que les résidus récupérés lors des extractions étaient bien de sophorolipides. En effet, les valeurs de  $R_f$  obtenues varient de 0,08 à 0,8, comparativement aux valeurs de 0,04 à 0,8 reportées dans la littérature (Asmer *et al.*, 1988 ; Davila *et al.*, 1993 ; Desphande et Daniels, 1995). En raison de l'absence de standard lors de ces analyses et celles publiées, la différence entre les données obtenues et celles reportées ne peuvent pas être considérées significativement différentes, d'autant plus que les bandes sont très similaires à celles publiées.

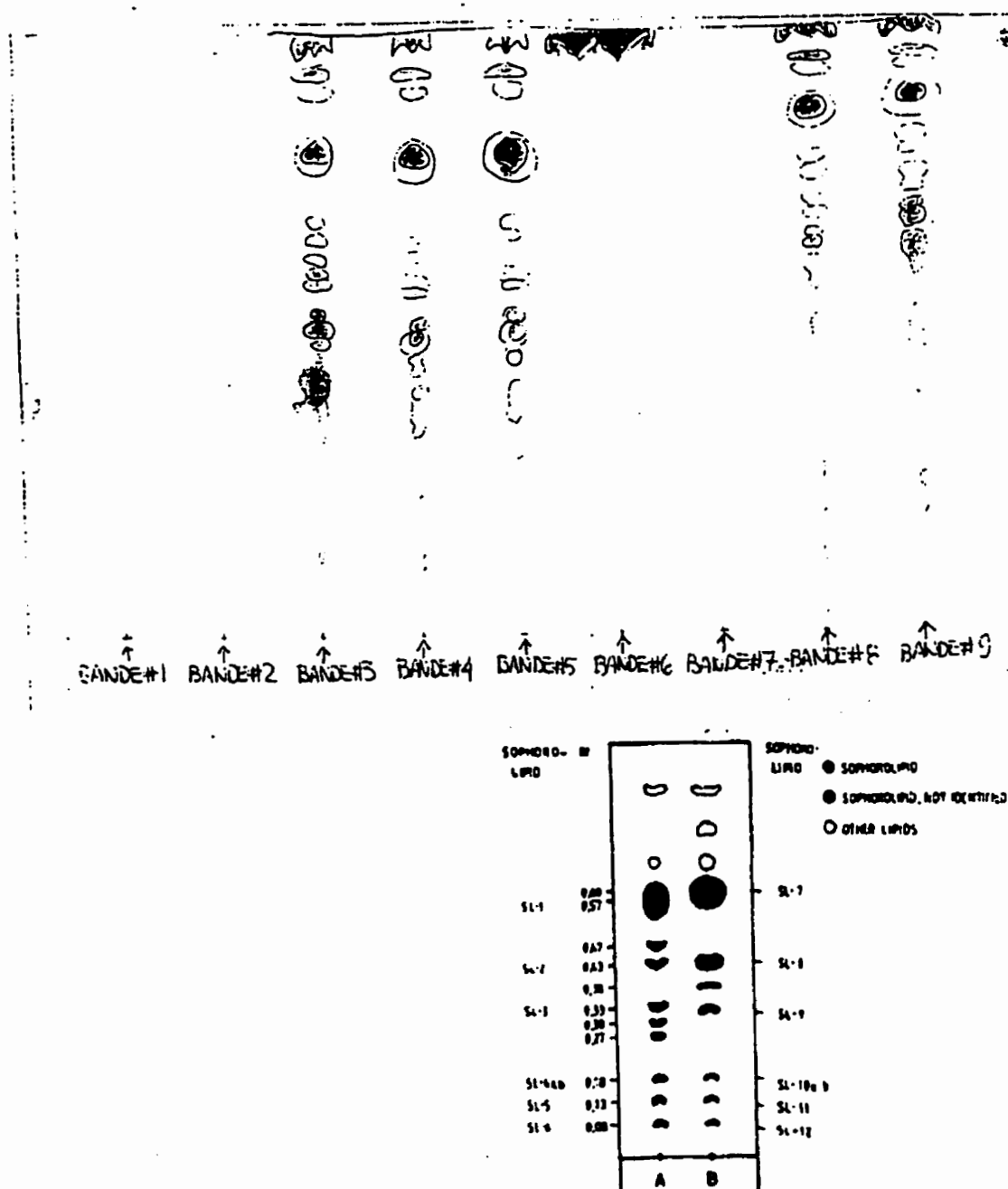


FIG. 2. Comparison of the TLC of crude sophorolipids from the glucosylated acid cultivation (A) and oleic acid cultivation (B). Detection: antiodaldehyde reagent.

Figure 3.10 Chromatographies en couche mince réalisées sur divers échantillons de milieu de production extraits à l'acétate d'éthyle. a) Résultats des productions en erlenmeyers. b) Données publiées par Asmer *et al.* (1988).

### **Conclusions des expériences en Erlenmeyer**

Aux termes de ces expériences, les conclusions furent les suivantes :

1. La substitution de l'huile végétale pure par de l'huile de canola provenant de l'industrie des croustilles n'a pas d'effet significatif sur la production des sophorolipides;
2. La mélasse non raffinée se substitue avantageusement au glucose comme source d'hydrates de carbones et la production de sophorolipides fut sensiblement plus élevée en présence de mélasse qu'en présence de glucose pur. Quelques explications sont possibles :
  - La mélasse peut contenir une source d'azote mieux assimilée par la levure que celle provenant de l'urée présente dans le milieu idéal. La concentration totale d'azote et ses sources sous formes différentes sont en effet des facteurs clés pour la production des sophorolipides (Zhou et Kosaric, 1995).
  - La mélasse agit comme agent tampon, or la plage de pH la plus favorable à la croissance des levures et à la production de sophorolipides tourne autour de 3,5. Dans les milieux contenant de la mélasse, le pH fut effectivement maintenu près de cette valeur sans qu'il y ait de contrôle exercé, alors que dans les milieux sans mélasse, le pH est rapidement descendu à 2,5 et s'y est maintenu.
3. Un manque d'oxygène dans le milieu a déclenché une hausse brusque de pH dans les milieux #3 et #4 (mélasse), entraînant l'atteinte d'un plateau dans la

production de sophorolipides et confirmant une inhibition par le produit, plus soluble à de tels pH.

4. La mélasse et l'huile végétale usée pourraient contenir des composés polymérisés plus difficiles à consommer pour les micro-organismes, ce qui expliquerait les taux de consommation plus faible

La substitution du glucose et de l'huile végétale pure par de la mélasse non raffinée et de l'huile de canola usée n'a donc pas inhibé de façon importante la production de sophorolipides, non plus que la production en milieu non stérilisé. Plus encore, la mélasse agit comme solution tampon et favorise le maintien d'un pH optimal de croissance et de production tout en constituant une source importante d'azote. Par conséquent, la production de sophorolipides en réacteur de 100 litres, dans un milieu non stérilisé à base de mélasse non raffinée et d'huile de canola usée fut engagée.

---



## **3.2. PRODUCTION EN RÉACTEUR**

---

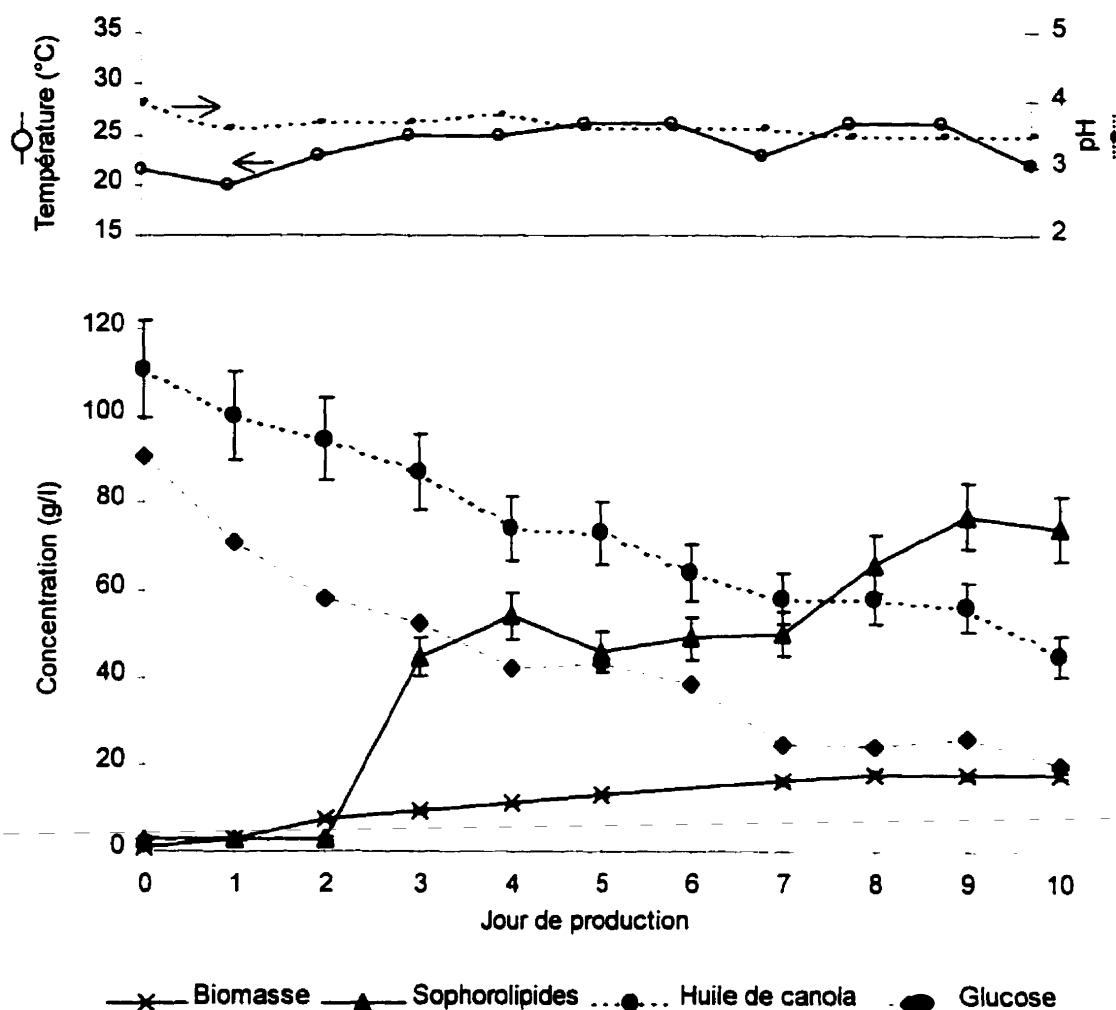
La production des sophorolipides en réacteur de 100 litres visait à évaluer le potentiel de production à grande échelle à partir des rejets industriels et dans un milieu non stérilisé. Le milieu utilisé fut le même que le milieu #4 précédent, soit le milieu à base de mélasse non raffinée (0,52g glucose/g mélasse) et d'huile de canola usée. Le volume produit fut de 80 litres et les conditions de production telles que décrites au chapitre 2. La production à partir d'un inoculum frais (produit en conditions stériles) et à partir d'une production âgée (provenant d'une fin de production) furent évaluées.

Un avantage à toute fin pratique considérable du milieu de production est l'absence de formation de mousse lors de l'agitation et l'aération vigoureuses qui y sont appliquées. En effet, la présence d'huile végétale dans le milieu empêche la formation de mousse. À titre informatif, l'odeur de levure dégagée par le milieu en production peut être désagréable pour certains et nécessiter une aération particulière.

### **3.2.1. PRODUCTION À PARTIR D'UN INOCULUM FRAIS**

Le suivi d'une production en réacteur à partir d'un inoculum frais est donné à la figure 3.11. L'erreur moyenne sur les mesures fut inférieure à 10%, et cette valeur est conservatrice par rapport aux résultats obtenus (voir le protocole P3C, en Annexe A, pour plus de détails). Néanmoins, les barres d'erreurs représentent une erreur maximale probable de 10% sur les mesures. La production en réacteur à partir d'un inoculum frais se compare avec les

productions en Erlenmeyer du milieu #4, pour lesquelles les données sont rassemblées à la figure 3.13.

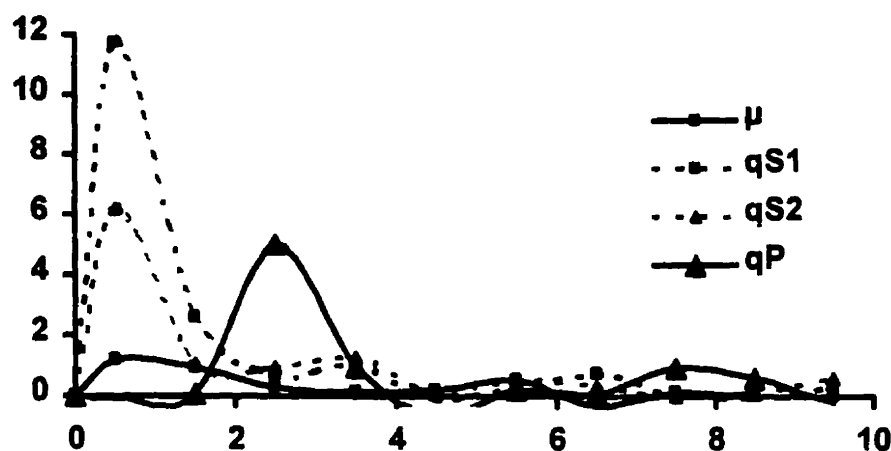


**Figure 3.11** Suivi de la production en réacteur de 100 litres dans un milieu contenant 9,1% de glucose sous forme de mélasse non raffinée et 9,5% d'huile de canola usée.

Le pH fut stable tout au long de la production à 3,5, une valeur optimale. La température du milieu s'est maintenue entre 20°C et 25°C, ce qui est un peu inférieur aux températures en Erlenmeyer mais demeure dans une plage

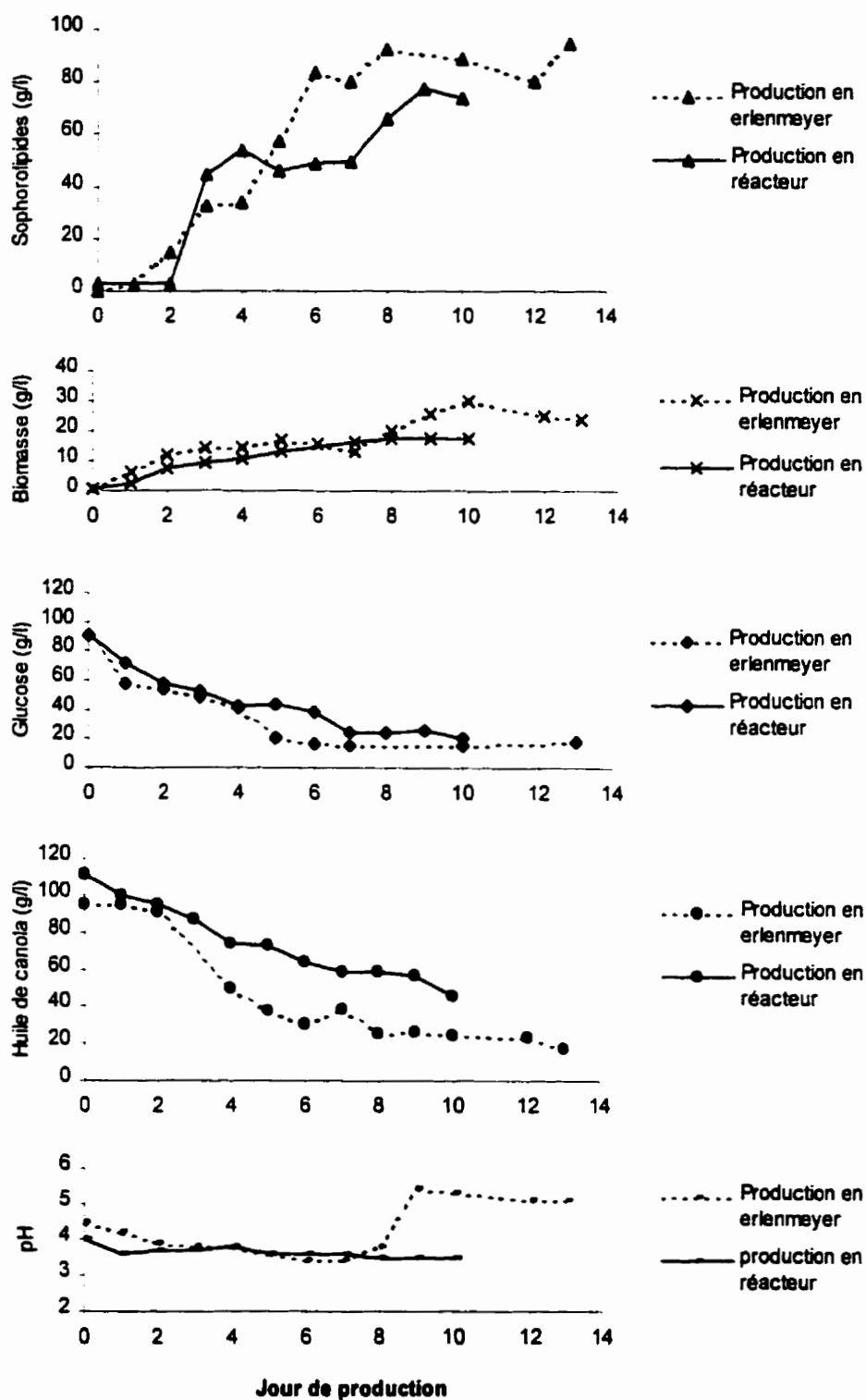
favorable à la production et à la croissance. Cette baisse est reliée à l'activité microbienne, qui fut ralentie, ainsi que le montrent les courbes de consommation de substrats (fig. 3.11). On remarque en effet que la mélasse fut consommée relativement lentement et qu'une quantité appréciable demeurait dans le milieu à partir du jour 7 de production, après quoi un plateau fut atteint à une concentration d'environ 20g/l de glucose (~40g/l de mélasse). L'hypothèse des composés polymérisés de la mélasse semble s'appliquer encore une fois. La même situation s'applique à l'huile végétale usée, qui fut consommée à taux relativement constant, mais demeurait toujours en concentration de 40g/l au jour 10 de production. La valeur initiale mesurée d'huile végétale (111g/l) reflète les difficultés d'échantillonnage en début de production et l'erreur dans ce cas fut plus élevée que 10%. La production en réacteur fut moins élevée qu'en Erlenmeyer et atteignit plus de 70g/l en 9 jours de production, pour un rendement par rapport aux substrats variant de 0,54g/g (calculé au jour 10, avec une concentration initiale en huile végétale de 111g/l) à 0,61g/g (calculé au jour 10, avec une concentration initiale en huile végétale de 95g/l).

Cette analyse des données de production est confirmée par une analyse en terme de cinétiques, c'est-à dire lorsque les taux de production et de consommation sont rapportés sur la biomasse présente dans le milieu (fig. 3.12). On remarque alors que la mélasse ( $q_{S1}$ ) sert principalement à la production de biomasse ( $\mu$ ) et qu'une période de consommation d'huile végétale ( $q_{S2}$ ) est suivie clairement d'une excrétion de sophorolipides ( $q_P$ ).



**Figure 3.12** Cinétiques de production en réacteur (80 l).  $\mu=(1/x)dx/dt$ , production de biomasse ;  $qS_1=(1/x)dS_1/dt$ , consommation de mélasse ;  $qS_2=(1/x)dS_2/dt$ , consommation d'huile végétale usée ;  $qP=(1/x)dP/dt$ , production de sophorolipides.

Maintenant, en comparant les données en Erlenmeyer et en réacteur initiées avec une culture pure (figure 3.13), on remarque la similarité des productions. La mise à l'échelle des flacons Erlenmeyer au réacteur fut par conséquent positive, quoique la production y ait été un peu moindre (environs 10g/l). Cette baisse est vraisemblablement reliée aux substrats qui semblent moins facilement consommés par les micro-organismes, en particulier l'huile végétale usée. Cette difficulté pourrait être contournée en laissant simplement décanter les particules solidifiées de l'huile végétale usée avant de l'utiliser dans le milieu de production.



**Figure 3.13** Comparaison des productions en Erlenmeyer et en réacteur.

Le taux de consommation de mélasse en réacteur fut similaire au taux de consommation en Erlenmeyer, mais tous les deux furent inférieurs au taux de consommation de glucose pur en Erlenmeyer. Deux facteurs peuvent expliquer ces taux plus faibles. D'abord, la forme polymérisée du glucose dans la mélasse qui serait plus difficilement assimilée par les micro-organismes ; la préparation d'un inoculum stérile formulé avec de la mélasse plutôt que du glucose pur permettrait d'acclimater les micro-organismes à ce substrat et d'en accélérer la consommation. Ensuite, la mélasse est très visqueuse et comme elle ne contient qu'environ 50% de glucose, le milieu de production avant inoculation contient environ 200g/l de mélasse. À cela s'ajoutent les 105g/l d'huile végétale qui contribuent à former avec la mélasse une solution de départ relativement dense ; il serait peut-être avantageux de compléter le milieu initial avec de l'eau tiède (30°C) plutôt que de l'eau à température ambiante (21°C), ce qui diminuerait la viscosité initiale du milieu tout en favorisant la dissolution de la mélasse et l'activité microbienne. Mais dans ce cas, il faudrait être certain d'inoculer immédiatement le milieu avec la culture de *Candida bombicola* avant que d'autres organismes opportunistes ne s'y développent. L'initiation de la production à 30°C pourrait peut-être permettre le maintien de cette température par le biais de l'activité microbienne, tout en permettant de rendre plus accessibles les particules polymérisées d'huile végétale usée qui fondent à température plus élevée.

Par conséquent, il faudrait vérifier l'impact des modifications ci-dessus, qui sont relativement simples d'application, avant de réduire les concentrations initiales de substrats (mélasse et huile) en raison des cinétiques observées en réacteur (i.e. concentrations finales en substrats élevées).

La substitution de l'urée dans le milieu "idéal" de départ par l'azote provenant de la mélasse a permis d'obtenir de bons rendements en sophorolipides (plus de 70g/l) et rend ce rejet doublement intéressant. De plus, son pouvoir tampon a permis de maintenir le pH à des valeurs moins acides et plus près du pH optimal. De plus, il est possible que la mélasse contienne les vitamines nécessaires, normalement apportées par l'extrait de levure, et permettrait d'éliminer ce dernier dans la formulation du milieu. Et si la mélasse ne permet de remplacer l'extrait de levure, un composé coûteux, il est possible de le remplacer par de la liqueur de fermentation de maïs (*corn steep liquor*) (Desphande et Daniels, 1995). Il s'agit d'un rejet liquide peu coûteux contenant des protéines produit lors de la fabrication de l'amidon à partir du maïs.

#### Conservation du bouillon de production

Le contenu brut du réacteur fut entreposé à 4°C à l'obscurité durant 2 mois dans un contenant hermétiquement fermé. Après cette période, trois échantillons furent prélevés et analysés pour leur contenu en sophorolipides, en biomasse, en huile végétale et en glucose. Les résultats d'extractions sont affichés au tableau 3.4. En tenant compte d'une erreur sur les mesures de 10%, on peut conclure que l'entreposage n'a pas d'effet majeur sur les caractéristiques constitutives du bouillon.

**Tableau 3.4** Influence de l'entreposage sur la solution de biosurfactants.

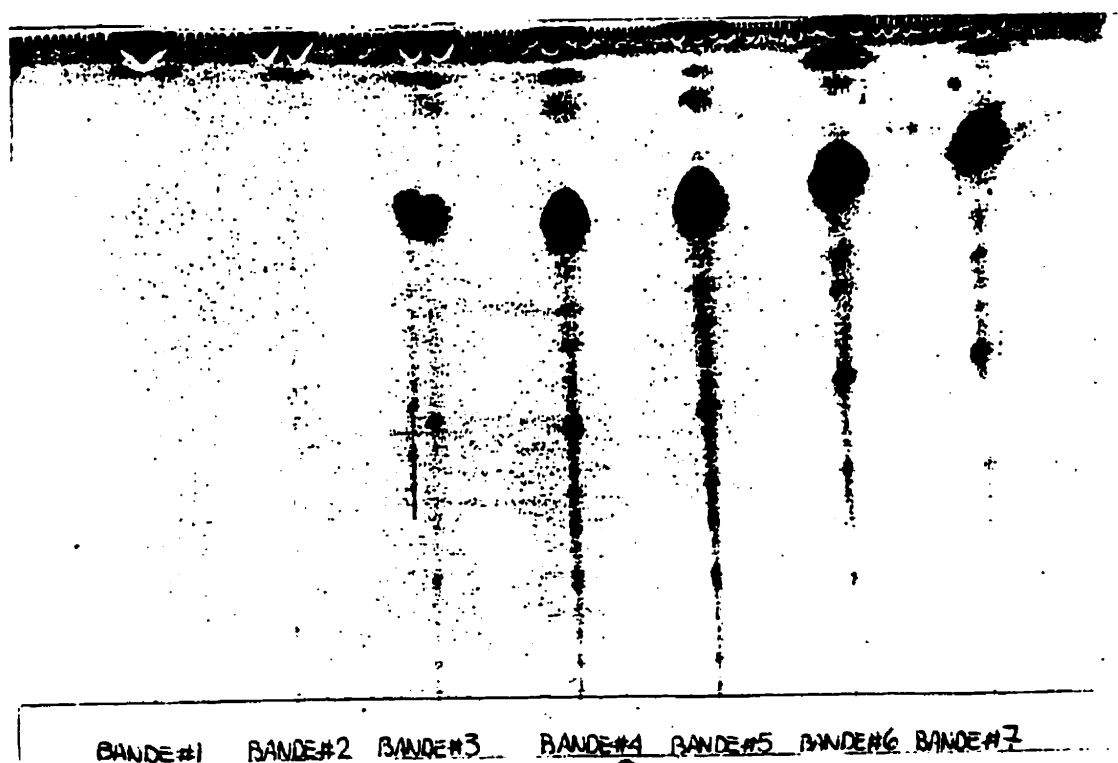
<i>Échantillon</i>	<i>Sophorolipides</i>	<i>Biomasse</i>	<i>Glucose (0,52g/g mélasse)</i>	<i>Huile de canola</i>
Jour 10	74g/l	19g/l	20g/l	45g/l
Jour 10 + 2mois	65g/l	14g/l	15g/l	46g/l

### **Chromatographie en couche mince**

Des chromatographies en couche mince ont été réalisées sur des échantillons provenant des jours 0 (témoin), 3, 7, 10 et du jour 10 après deux mois d'entreposage. Ces analyses visaient à confirmer la présence des sophorolipides ainsi qu'à détecter une évolution dans le mélange des sophorolipides en cours de production. Les échantillons appliqués provenaient de la phase organique résultant de l'extraction à l'acétate d'éthyle, précédant l'évaporation et le lavage à l'hexane pour retirer l'huile végétale résiduelle. Un échantillon de sophorolipides purifiés resuspendus dans l'acétate d'éthyle fut aussi appliqué.

La figure 3.14 montre les chromatogrammes de ces échantillons. Le spot laissé par l'huile végétale est visible sur toutes les bandes, sur la ligne de front. Ces spots sont en effet identiques à celui révélé sur la bande #1, qui représente un échantillon d'huile végétale usée diluée dans l'acétate d'éthyle (10g/l). La bande #2 représente le chromatogramme d'un échantillon pris au jour 0 avant inoculation (témoin). Les bandes #3, #4 et #5 représentent les chromatogrammes d'échantillons prélevés aux jours 3, 7 et 10 de production, respectivement. Afin de voir si l'entreposage de la solution de biosurfactants avait un effet sur la composition du mélange de sophorolipides, un échantillon du jour 10 de production après deux mois d'entreposage à 4°C fut appliqué (bande #6). Pour vérifier la qualité des purifications (particulièrement le lavage à l'hexane destiné à retirer l'huile végétale résiduelle) lors des analyses, le même échantillon purifié fut resuspendu dans l'acétate d'éthyle (5g/l) et appliqué (bande #7).





**Figure 3.14** Chromatographies en couche mince d'échantillons provenant d'une production en réacteur à partir d'un inoculum frais. L'identification des bandes est décrite dans le texte.

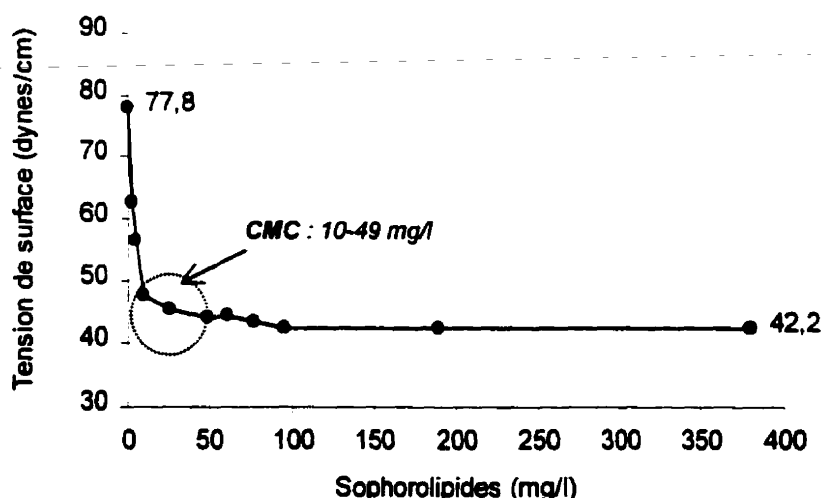
On voit que les bandes #1 et #2 ont révélé le même spot, soit celui de l'huile végétale, le seul élément non polaire dans le milieu de production initial (bande #2). Ce spot est retrouvé dans toutes les bandes, en proportion relativement importante (grosueur du spot) et confirme que l'huile végétale fut présente dans le milieu tout au long de la production. La bande #7 montre également le spot d'huile végétale, quoique sa grosueur est beaucoup plus réduite par rapport aux autres échantillons, ce qui signifie que l'étape de lavage à l'hexane durant les extractions n'a pas retiré complètement l'huile végétale du mélange de sophorolipides.

L'examen des échantillons provenant du bouillon de production à différents jours permet d'affirmer qu'il n'y a pas de variation significative de la composition du mélange de sophorolipides au cours d'une même production, ce qui concorde avec les résultats publiés dans la littérature (Cooper et Paddock, 1984 ; Klekner *et al.*, 1991). Les valeurs de  $R_f$  calculées pour la bande #4 (échantillon appliqué au centre horizontal de la plaque) varient de 0,06 à 0,7 (le spot le plus gros sur chaque bande et qui est associé à la forme SL-1, lactone), ce qui se compare aux valeurs de  $R_f$  reportées pour les sophorolipides (0,04 à 0,8).

L'apparence de migration vers le haut des échantillons appliqués de par et d'autre du centre de la plaque (bandes #1, #2, #3, #5, #6 et #7) est reliée à un effet de bord plutôt qu'à un changement de composition du mélange. Ceci fut vérifié en appliquant le même échantillon à des endroits différents sur la plaque : la même répartition en "V" écrasé des spots d'une bande à l'autre fut observée.

### Tension de surface et concentration micellaire critique

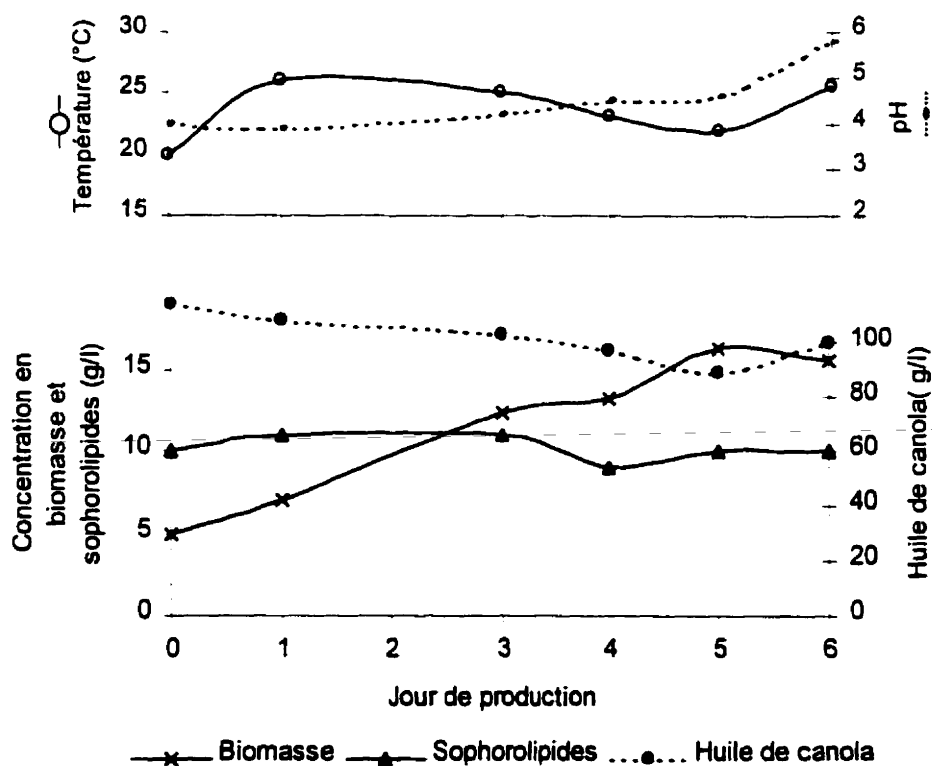
Les sophorolipides analysés provenaient de la solution entreposée durant deux mois, produite en réacteur à partir de mélasse et d'huile végétale usée. Après extraction, séchage et broyage, les sophorolipides se présentaient sous forme de poudre un peu collante d'odeur sucrée, de couleur blanchâtre. Une solution aqueuse à 380mg/l de ces sophorolipides fut préparée. La tension de surface de cette solution trouble fut mesurée pour diverses concentrations (figure 3.15). La tension de surface du mélange fut mesurée à 42,2 dynes/cm pour une tension de surface de l'eau distillée de 77,8 dynes/cm. Les données publiées dans la littérature rapportent une tension de surface de 30 dynes/cm (Cooper et Paddock, 1984) à 33 dynes/cm (Zhou et Kosaric, 1995) pour les sophorolipides pour une tension de surface de l'eau distillée de 72 dynes/cm. La concentration micellaire critique fut mesurée au voisinage de 25 mg/l (figure 3.15) en sophorolipides, ce qui est moins élevé que les valeurs de 60mg/l et 82mg/l rapportée par Hommel (1990) et Cooper et Paddock (1984), respectivement.



**Figure 3.15** Concentration micellaire critique du mélange de sophorolipides purifiés produits par *Candida bombicola* à partir de mélasse et d'huile de canola usée dans un milieu non stérilisé.

### 3.2.2. PRODUCTION À PARTIR D'UN INOCULUM ÂGÉ

La production de sophorolipides en réacteur à partir d'inoculum âgés (i.e. production précédente) fut évaluée afin de mesurer le potentiel de productions consécutives sans recourir à la préparation d'un inoculum frais en milieu stérilisé. Les conditions et le milieu furent les mêmes que pour les productions à partir d'inoculum frais. La production à partir d'un inoculum (10%v/v) provenant d'un milieu de production âgé de 10 jours est illustrée à la figure 3.16.



**Figure 3.16** Production en réacteur de 100 litres à partir d'un inoculum âgé de 10 jours et d'un milieu contenant 9,1% de glucose sous forme de mélasse non raffinée et 9,5% d'huile de canola usée.

On voit que la production ne fut pas favorisée, la concentration en sophorolipides dans le milieu s'étant maintenue à une valeur de 10g/l, soit à peu près la concentration amenée par l'inoculum âgé. Celui-ci avait en effet une concentration de 74g/l de sophorolipides dont 8 litres furent répartis dans 80 litres de milieu totaux. L'absence de production de sophorolipides concorde avec l'absence de consommation de l'huile végétale qui est habituellement reliée à la synthèse des sophorolipides. Environ 10g/l de masse cellulaire ont cependant été produits durant les 6 jours de productions. Mais les valeurs de pH qui se sont maintenues au-delà du pH initial de 4,0 indiquent un comportement différent de celui escompté pour *Candida bombicola*, qui aurait dû faire descendre le pH à au moins 3,5.

### **Maintien d'une culture *Candida bombicola* en production**

Des décomptes microbiens réalisés à différents temps sur les milieux de productions fournissent l'explication de l'absence de production à partir d'un inoculum âgé de 10 jours. Des décomptes sur milieux sélectifs pour levures et hétérotrophes totaux ont été réalisés sur des échantillons provenant du milieu frais avant inoculation (jour 0), du milieu après 10 jours de production (jour 10) qui servit d'inoculum à la production suivante, puis au sixième jour de la production à partir de l'inoculum âgé de 10 jours (jour 6') (tableau 3.5). Les données pour le jour initial de la production à partir du milieu âgé (jour 0') ont été calculées avec les données du jour 10 de la production précédente et de la contamination initiale du milieu (jour 0).

Les données fournies au tableau 3.5 montrent clairement la croissance de la levure *Candida bombicola* durant la production à partir d'un inoculum frais (croissance de 9 log). Cependant, les décomptes effectués sur le milieu initial

(non inoculé) ont aussi révélé la présence d'une autre levure (*Autre levure I*) dans le milieu de production. Par ailleurs, cette deuxième levure eût aussi une croissance significative (6 log) durant la production à partir d'un inoculum frais, tandis qu'un troisième micro-organisme (*Autre levure II*) fut observé en fin de production (jour 10). Aucune bactérie ne fut observée sur ces décomptes, tandis que tous les autres organismes sauf le dernier (*Autre levure II*) croissaient indifféremment du milieu nutritif sur lequel ils étaient étalés. Bien que *Candida bombicola* ait conservé sa supériorité numérique durant la production à partir d'un inoculum frais, les autres micro-organismes ont crû relativement rapidement en parallèle et ne semblaient pas gênés ou inhibés par le milieu.

**Tableau 3.5** Décomptes microbiens (Unités Formant des Colonies/ml d'échantillon).

Échantillon	Micro-organisme observé			
	<i>Candida bombicola</i>	Bactéries	<i>Autre levure I</i>	<i>Autre levure II</i>
Jour 0	ND	ND	9 exp2	ND
Jour 10	1,4 exp9	ND	5,6 exp8	2,2 exp8
Jour 0'	1,4 exp8	ND	5,6 exp7	2,2 exp7
Jour 6'	1 exp8	ND	2 exp9	4exp9

ND : non détecté.

Il devint évident lors des décomptes que les micro-organismes opportunistes croissaient plus rapidement que *Candida bombicola*. En effet, les autres micro-organismes prenaient deux jours pour croître sur les géloses alors que *Candida bombicola* en prenait normalement 3. Au niveau d'une production en milieu liquide, cela signifiait que ces autres micro-organismes consommaient les substrats et se multipliaient avant *Candida bombicola*, malgré un inoculum de

départ fort (10% v/v). Cette hypothèse se confirma avec l'expérience à partir d'un inoculum âgé, où *Candida bombicola* n'a pas crû (et où il n'y a donc pas eu de production de sophorolipides) alors que la masse cellulaire des autres micro-organismes (des levures) a augmenté (tableau 3.4). Ces deux derniers ont eût une croissance de 2 log chacun, ce qui concorde avec la courbe de croissance de biomasse de la figure 3.14 qui est modérée.

D'après ces résultats, des productions successives de sophorolipides à partir d'un inoculum âgé ne sont pas applicables en milieu non stérilisé. Des enrichissements en milieux liquides stériles suivi d'étalement sur géloses ont permis d'identifier la source de contamination. L'huile végétale usée, la mélasse non raffinée et l'extrait de levure ont été étudiés pour leur contenu microbien. Les enrichissements (1% p/v) visaient à augmenter la masse microbienne présente dans chaque substrat pour que celle-ci soit observable par étalement sur géloses. Après incubation de 2 jours à 30°C en milieu liquide, les milieux contenant de la mélasse et de l'huile végétale usée montraient des signes de croissance microbienne (milieu trouble). Suite aux étalements sur géloses, seuls les milieux contenant de la mélasse (duplica) ont montré une croissance microbienne importante. Les autres n'ont donné lieu à aucune croissance. Enfin, ces micro-organismes observés au microscope (contraste de phase, 400X) se sont montrés similaires aux micro-organismes opportunistes détectés lors des décomptes sur les milieux de production. Il fut donc conclu que la contamination du milieu par d'autres levures prenait son origine dans la mélasse utilisée comme substrat.

### 3.3. CONCLUSIONS SUR LA PRODUCTION DE SOPHOROLIPIDES

---

Les expériences menées sur la production de sophorolipides par la levure *Candida bombicola* ATCC 22214 ont permis de démontrer la faisabilité d'un procédé opérant sous conditions non stériles. La synthèse des biosurfactants est non associée à la croissance de la biomasse et suit un processus enzymatique en présence d'huile végétale. Les résultats ont montré que le mélange de biosurfactants produits était de même qualité et de même caractéristique que ceux produits en milieu stérile. Au surplus, le remplacement du glucose pur par de la mélasse non raffinée et de l'huile végétale pure par de l'huile de canola ayant servi à la friture de croustilles est avantageux pour une production à partir d'un inoculum pur. En contrepartie, la préparation d'un inoculum pur est nécessaire dans ces conditions avant chaque production en raison des micro-organismes présents dans ces rejets qui prennent avantage du milieu de production.

Avec de la mélasse non raffinée et de l'huile de canola usée, la production de plus de 70g/l de sophorolipides fut obtenue en réacteur contenant 80 litres de milieu non stérilisé avant inoculation. Ces sophorolipides permettent d'abaisser la tension de surface de l'eau de 77,8 dynes/cm à 42,2 dynes/cm. La concentration micellaire critique fut évaluée au voisinage de 25 mg/l. La présence d'huile végétale dans le milieu empêche la formation de mousse dans le réacteur, un problème fréquent durant les fermentations biologiques et les productions de surfactants. Enfin, l'entreposage durant deux mois de la solution brute de production à 4°C n'a pas affecté significativement les propriétés du mélange de sophorolipides.



Suivant ces résultats, les principaux obstacles à la production à grande échelle des biosurfactants (définis par Healy et ses collaborateurs, 1996 et rapportés à la section 1.3.2.6 du présent document) ont été surmontés, seule la caractérisation précise du produit n'ayant pas été accomplie. Cette dernière n'est cependant pas essentielle à des fins d'utilisation comme solution pour le lavage de sol.

## CHAPITRE 4

### LAVAGES DE SOL CONTAMINÉ AUX HYDROCARBURES SEMI- ET

### NON-VOLATILS

### -RÉSULTATS ET DISCUSSION-

*Les biosurfactants produits sous les conditions présentées au chapitre 3 possèdent les mêmes propriétés que ceux produits en milieu stérile à partir de substrats purs. Mais l'efficacité de ces biosurfactants, un mélange de sophorolipides, ne fut pas démontrée et rarement étudiée pour le lavage de sols contaminés. Le présent chapitre se penche sur le potentiel des sophorolipides, normalement destinés à l'industrie cosmétique, à désorber ou mobiliser les contaminants hydrophobes d'un sol. Les essais se sont concentrés sur l'habileté des solutions brutes de production de sophorolipides à laver les sols contaminés aux hydrocarbures semi- et non-volatils regroupés sous les C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.*

#### 4.1. LAVAGES DE SOL AVEC LES SOPHOROLIPIDES

Le potentiel des sophorolipides pour le lavage d'un sol contaminé selon des mécanismes de désorption, solubilisation ou mobilisation des contaminants fut rarement évalué, les études à leur sujet portant surtout sur leur mode de production et leur synthèse. Les essais réalisés dans la présente recherche visaient à évaluer globalement ce potentiel. Les résultats obtenus doivent par conséquent être considérés comme sommaires pour la poursuite de cette piste, puisque les mécanismes par lesquels les sophorolipides agissaient n'ont pas été étudiés. L'évaluation de l'efficacité des lavages passait par l'analyse en contaminants dans le sol après lavage par rapport à sa contamination initiale.

##### 4.1.1. ESSAIS PRÉLIMINAIRES : SOLUTION DE SOPHOROLIPIDES PRODUITE EN MILIEU IDÉAL STÉRILE

Les résultats des essais préliminaires (étape 3 du plan de travail) sont présentés au tableau 4.1. En comparaison avec des lavages au Witconol SN-70, les solutions brutes de production de sophorolipides ont montré une efficacité comparable à laver les sols contaminés et c'est à partir de ces résultats que la recherche fut poursuivie avec *Candida bombicola* ATCC 22214.

**Tableau 4.1** Essais préliminaires de lavage sur un sable grossier.

Surfactant	Concentration en C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> dans le sol après lavage	Enlèvement %
Solution brute de production de sophorolipides	1 600 ± 200 mg/kg sec	88
Witconol SN-70 (surfactant synthétique)	2 100 ± 250 mg/kg sec	84

#### 4.1.2. SOPHOROLIPIDES PRODUITS EN RÉACTEUR

La composition des solutions brutes de sophorolipides employées pour les lavages est fournie au tableau 4.2 et reprends les données présentées à la section 3.2 du chapitre précédent.

**Tableau 4.2** Composition de la solution brute de sophorolipides.

<i>Composé</i>	<i>Concentration (g/l)</i>
Sophorolipides	$70 \pm 7$
Biomasse	$19 \pm 2$
Huile de canola usée	$45 \pm 5$
Glucose (0,52g glucose/g mélasse)	$20 \pm 2$

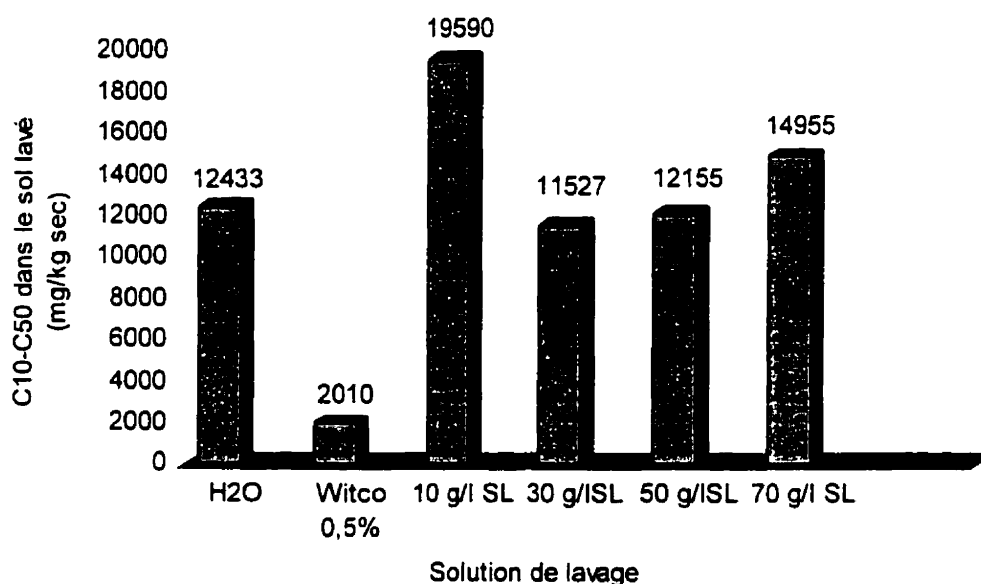
##### 4.1.2.1 Lavages à 50°C

Le chauffage du milieu de lavage, composé de la solution de lavage et du sol contaminé, entraînait la formation d'un complexe relativement compact. La formation de cet amalgame de volume supérieur au volume de sol initial peut être attribuée à la présence de mélasse et d'huile végétale dans la solution de lavage.

Les solutions de lavages se composaient de solution brute et d'eau courante. Le tableau 4.3 donne la composition en sophorolipides pour diverses dilutions de la solution brute employée comme solution de lavage. En raison de la réaction particulière du milieu, les lavages à 50°C furent inopérant (figure 4.1). Les données en abscisse de la figure 4.1 représentent la concentration de sophorolipides dans la solution de lavage. Les deux premières colonnes de la figure représentent les résultats de lavage à l'eau pure et au Witconol SN-70.

**Tableau 4.3** Concentrations en sophorolipides dans les solutions de lavage.

Dilution (ml solution brute/ml total)	0,15	0,40	0,70	1,00
Concentration en sophorolipides (g/l)	10	30	50	70

**Figure 4.1** Lavages à 50°C d'un sol contaminé à 13 400mg/kg.

Parmi ces essais à 50°C, le lavage à l'eau ne fut pas efficace et le sol lavé montra une contamination similaire à la contamination du sol initial (fig.4.1). En contrepartie, le Witconol SN-70 permet d'abaisser la contamination de 85%, pour une concentration résiduelle de 2010 mg/kg en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol sec. Enfin, en raison de la particularité de la matrice sol/solution de biosurfactants, les résultats de lavage à 50°C avec cette solution ne furent pas concluants mais ils ont permis de détecter la problématique liée à la présence d'huile végétale pour la méthode analytique des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.

Il fut en effet clair, à partir des observations en cours des lavages et de ces analyses, que l'huile végétale restée fixée dans le sol à la suite de la formation de la matrice épaissie causait une interférence dans les analyses. Ainsi, les composés de l'huile de canola ont pu être analysés en terme de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> (tableau 4.4), signifiant que la méthode d'analyse n'était pas assez spécifique. Certains auteurs (Bhandari *et al.*, 1994) ont relevé la question de la spécificité dans la méthode 9071 de l'U.S.EPA, qui détectait des composés autres que des hydrocarbures et donnait par conséquent des valeurs erronées trop élevées de concentrations en hydrocarbures pétroliers totaux (TPH). Dans leurs recherches, ils ont modifié la méthode d'analyse pour qu'elle soit plus spécifique.

**Tableau 4.4** Détection des composés non polaires de l'huile de canola.

<i>Plage d'hydrocarbures</i>	<i>Huile de canola pure 100%</i>	<i>Huile de canola usée</i>
C <sub>10</sub> -C <sub>19</sub>	< 1 000 µg/ml	< 1 000 µg/ml
C <sub>20</sub> -C <sub>29</sub>	1 310 µg/ml	4 150 µg/ml
C <sub>30</sub> -C <sub>39</sub>	2 950 µg/ml	4 550 µg/ml
C <sub>40</sub> -C <sub>50</sub>	23 700 µg/ml	43 400 µg/ml
C <sub>10</sub> -C <sub>50</sub>	< 28 960 µg/ml	< 53 100 µg/ml

Dans la méthode d'analyse employée pour l'analyse des contaminants (dosage des hydrocarbures pétroliers, annexe A), il aurait fallu faire passer les échantillons extraits à l'hexane dans une colonne de silice plutôt que d'ajouter de la silice dans l'extrait, ce qui aurait permis de séparer l'huile végétale, plus polaire que les produits pétroliers, des contaminants réels. Ces constatations quant à la confusion des hydrocarbures pétroliers et de l'huile végétale dans les analyses permet de pondérer les résultats subséquents. En effet, la

méthodologie employée pour le retrait des solutions de lavage ne permettait pas de retirer toute l'huile végétale visible du sol lavé sans entraîner avec elle une portion significative de celui-ci, suggérant la présence d'huile sous forme libre dans les échantillons. N'ayant pas prévu sa détection de pair avec les hydrocarbures pétroliers, ce facteur ne fut pas corrigé avant la fin d'une première série d'essais. En conséquence, les essais qui suivirent furent réalisés de façon identique afin de pouvoir les comparer. C'est pourquoi, *pour les résultats présentés dans ce chapitre, les concentrations finales en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> doivent être considérées comme des concentrations en composés de polarités similaires ; en raison de la présence d'huile végétale dans les solutions ayant servi au lavage du sol, ces concentrations ne peuvent être attribuées uniquement à la présence d'hydrocarbures pétroliers.*

Les concentrations mesurées en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> représenteraient donc au maximum une concentration en hydrocarbures pétroliers, mais fort probablement une concentration en hydrocarbures pétroliers adsorbés combinée à une concentration en huile végétale libre, un résidu de lavage. En prenant pour exemple une solution de lavage composée à 30g/l de sophorolipides et 18g/l d'huile végétale usée (soit une solution de lavage composée de 40% v/v de solution brute), il est possible d'estimer pour 22g de sol lavé (15% p/v de sol) la concentration en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> apportée par l'huile végétale. Comme l'huile usée contient 53 100µg/ml de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>, près de 18 500 (mg C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>)/(kg de sol sec) sont mis en contact avec le sol durant les lavages. Ainsi, il suffit que 0,6ml d'huile végétale soient présents dans l'échantillon de sol lavé pour y mesurer une concentration de 1500 mg/kg en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.

Enfin, les sophorolipides pourraient également être responsables de l'interférence avec la méthode d'analyse des contaminants. En effet, l'interférence des surfactants avec les analyses d'hydrocarbures pétroliers fut relevée par Selvakumar et ses collaborateurs (1995). Les biosurfactants se caractérisent par des polarités peu élevées, ainsi que l'ont révélé les analyses chromatographiques en couche mince discutées au chapitre précédent. Il est donc probable que des biosurfactants résiduels dans le sol lavé, notamment les sophorolipides peu solubles qui se déposent visiblement durant la décantation de la solution de lavage, interfèrent avec les analyses de contaminants pour donner des mesures plus élevées que les valeurs réelles. Cependant, les sophorolipides sont insolubles dans l'hexane. Comme les sols furent extraits avec ce solvant pour en retirer les contaminants, il n'y a probablement pas ou peu d'interférences causées par les sophorolipides pour l'analyse des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.

#### 4.1.2.2 *Lavages à 21°C*

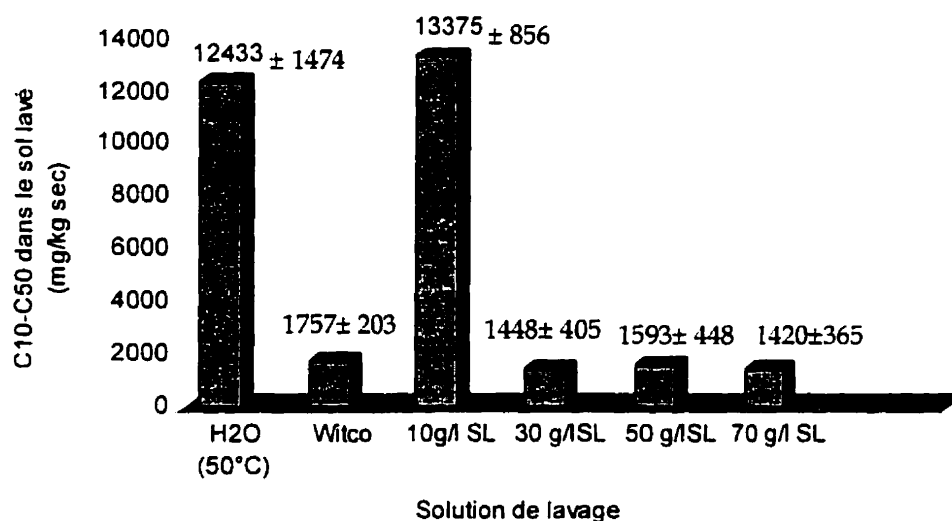
À l'inverse des essais à 50°C, aucune réaction physique du milieu ne fut observée au cours des lavages. Il semble donc que ce soit une réaction initiée par la chaleur qui a eu lieu lors des lavages à 50°C.

Après décantation du sol dans la solution de lavage, trois phases étaient en présence, soit une phase solide (sol), une phase aqueuse limpide et une phase organique légère. Cette dernière était, après lavage, teintée noire et opaque. Par conséquent, le lavage de sol et la décantation de la solution de biosurfactants brisèrent l'émulsion initiale formée par les sophorolipides et l'huile végétale du milieu de production (solution homogène de coloration brune). De plus, une couche de sophorolipides non solubles se déposait sur le



sol (dépôt beige) en cours de décantation. Les résultats pour ces lavages sont présentés à la figure 4.2.

Une hausse de température n'a pas affecté l'efficacité du Witconol SN-70 et celle-ci fut similaire pour les lavages à température ambiante et les lavages à 50°C (fig.4.2). Puisqu'un lavage à l'eau à 50°C n'avait pas permis de retirer les contaminants du sol, le même essai à 21°C ne fut pas réalisé.



**Figure 4.2** Lavages à 21°C d'un sol contaminé (13 400 mg/kg)

Les solutions de biosurfactants furent efficaces pour des concentrations en sophorolipides supérieures ou égale à 30g/l. Au-delà de cette concentration, l'enlèvement ne fut pas amélioré. La forte différence entre les lavages à 10g/l et 30g/l de sophorolipides est peut être reliée à la solubilisation des contaminants par l'action des micelles. Même si ces concentrations en sophorolipides se situent bien au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC) de 25 mg/l

(0,08g/l), il est possible que la présence d'huile végétale dans le milieu en augmente la valeur effective parce qu'elle occuperait elle-même les micelles, ce qui repousserait la valeur de la CMC.

De façon globale, les solutions sont opérantes sous forme diluée et non purifiées et semblent retirer légèrement plus de contaminants que le surfactant synthétique (Witconol) pour les concentrations évaluées. Enfin, la figure 4.2 montre que les concentrations en  $C_{10}$ - $C_{30}$  dans le sol lavé avec des solutions comportant au moins 30g/l de sophorolipides furent inférieures au critère C (3500mg/kg) du Ministère de l'environnement et de la faune. Mais comme indiqué précédemment, si une partie de ces concentrations est attribuable à de l'huile végétale (biodégradable), la concentration finale en contaminants pétroliers dans ce sol pourrait s'approcher de la limite inférieure du critère B (700mg/kg).

## 4.2. INFLUENCE DE L'HUILE VÉGÉTALE SUR LES LAVAGES

---

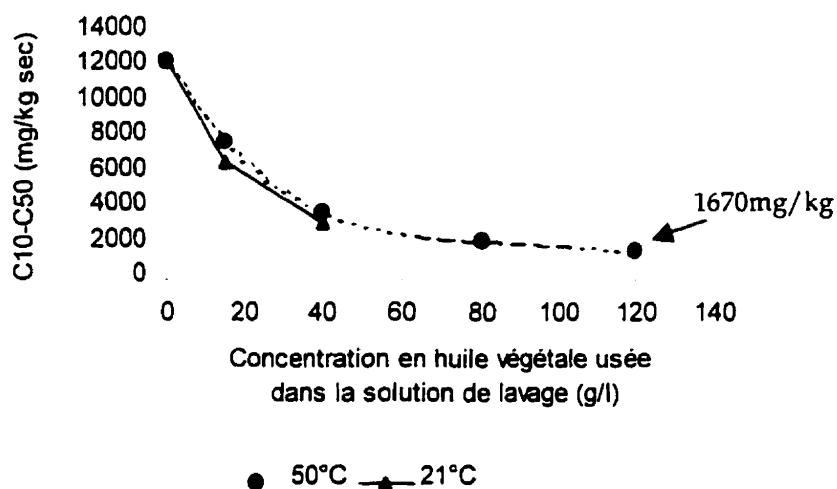
Bien que la présence d'huile végétale ait interféré dans les résultats d'analyse, la similarité entre les polarités des composés de l'huile végétale et les hydrocarbures pétroliers a révélé un aspect peu étudié de l'huile. Ainsi, s'il est peu probable qu'elle s'adsorbe sur le sol au cours des lavages (en raison de la disponibilité des sites d'adsorption), il est possible que celle-ci agisse comme agent d'extraction pour les hydrocarbures pétroliers et puisse à elle seule favoriser le transfert des contaminants pétroliers de la phase solide à la phase aqueuse.

Les analyses de  $C_{10}$ - $C_{50}$  de l'huile de canola laissent présumer de la miscibilité de cette dernière avec toute la plage d'hydrocarbures pétroliers. En fait, cette miscibilité ne serait pas étonnante puisque l'huile végétale est couramment extraite par des solvants à base d'hydrocarbures, comme l'hexane employé pour l'extraction de l'huile de soja, deux composés complètement miscibles (Treybal, 1980). L'originalité demeure toutefois dans l'application inverse de cette propriété, où l'huile agirait comme solvant lourd. Afin d'étudier cette perspective, des essais de lavages supplémentaires furent ajoutés aux séries initiales. Dans la poursuite des objectifs de la recherche, l'huile de canola usée (provenant de l'industrie des croustilles) fut préférée à l'huile de canola pure pour la réalisation de ces essais.

Aucune publication sur une telle utilisation de l'huile végétale ne fut recensée, mais une équipe de chercheurs (Université technique d'Hamburg-Harburg

(TUHH), Allemagne<sup>1</sup>) en mentionne la possibilité. Selon les informations disponibles, ils ont évalué l'utilisation de l'huile végétale pour l'extraction des composés aromatiques polycycliques (HAP) d'un sol (Fisher, 1995)<sup>2</sup>. Ces données n'ont pas été publiées mais les chercheurs énoncent encore l'utilisation de l'huile végétale dans leurs travaux avec les HAP.

Les résultats obtenus pour la série d'essais ne comportant pour seul agent de lavage que de l'huile végétale usée confirment l'hypothèse avancée quant à son rôle de solvant lourd. La figure 4.3 montre en effet une efficacité certaine de ce produit biodégradable et peu coûteux pour le lavage des sols contaminés.



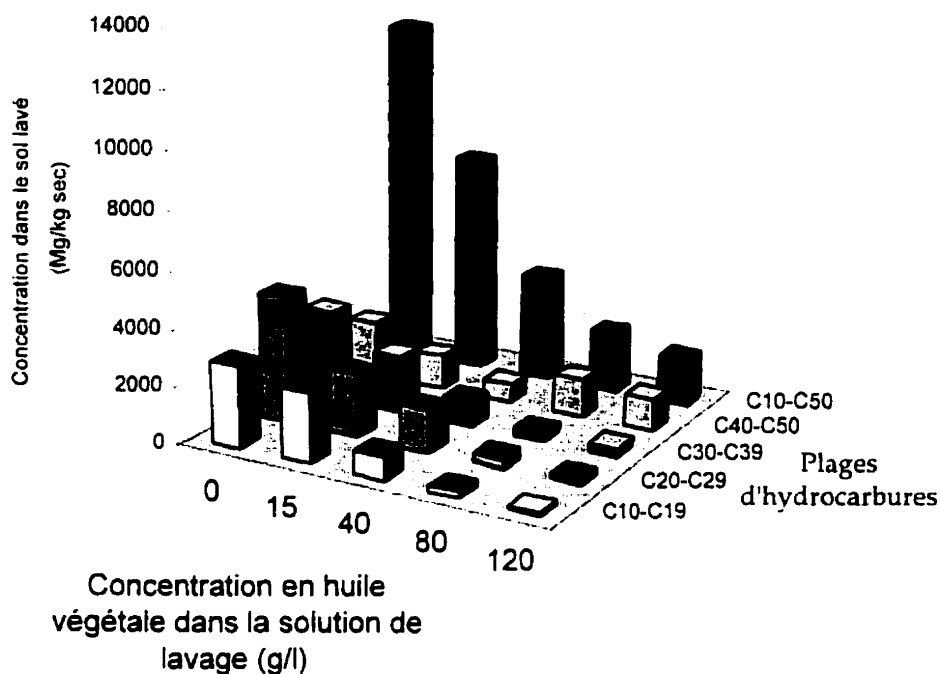
**Figure 4.3** Lavages de sol avec de l'huile de canola usée.

<sup>1</sup> <http://www.tu-harburg.de/aws/index-e.html>

<sup>2</sup> <http://www.tu-harburg.de/aws/sfb/sfb-lit2.html>

Pour une concentration de 120g/l d'huile végétale dans la solution de lavage, près de 88% des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> furent retirés, pour une concentration dans le sol lavé de 1 670mg/kg sec, sous le critère C de restauration. Il n'y eut pas d'effet significatif sur le lavage d'une baisse de la température de 50°C à 21°C (figure 4.3). Ce résultat confirme celui obtenu pour le Witconol et indique qu'une température de 50°C n'influence pas significativement la solubilité des contaminants et les constantes d'équilibres (désorption).

La courbe de la figure 4.3 s'approche asymptotiquement de l'axe des x et suggère qu'un enlèvement complet des contaminants serait difficile à atteindre, sinon impraticable, simplement en augmentant la concentration en huile végétale. Le plateau atteint pour des solution à plus de 100g/l en huile végétale pourrait être relié aux constantes d'équilibre (limitation thermodynamique), mais les expériences réalisées en mode cuvée ne permettent pas de le confirmer. Par contre, la résistance au transfert à ces concentrations est vraisemblablement due aux pores du sol (limitation cinétique), et ce facteur est fonction du solide, non du solvant ou de sa concentration (Treybal, 1980). L'analyse fractionnée des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans les échantillons de sol lavé appuie cet énoncé (fig. 4.4). Il est à noter en effet que les concentrations ont diminué pour toutes les plages d'hydrocarbures, signifiant que l'huile agit sur toutes les fractions et que la contamination résiduelle n'est pas due à une incompatibilité du solvant.



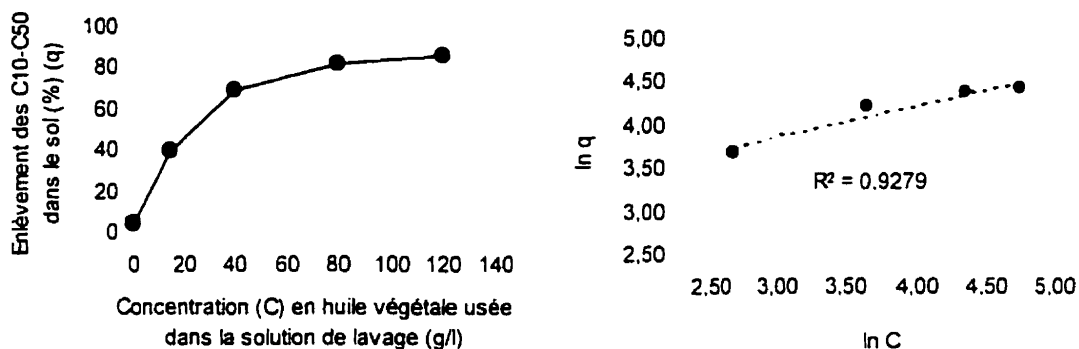
**Figure 4.4** Enlèvement par fraction d'hydrocarbures, en fonction de la concentration d'huile végétale dans la solution de lavage.

La forme de la courbe reliant les points de la figure 4.3 suggère qu'une relation mathématique reliant l'enlèvement des contaminants et la concentration en huile végétale de la solution de lavage (fig.4.5a) puisse être élaborée. Une relation logarithmique pourrait permettre d'évaluer le potentiel d'une solution de lavage à base d'huile végétale (fig. 4.5b). En raison des expériences réalisées, la formulation d'une équation à cette étape serait prématurée. Néanmoins, les données indiquent une nette tendance et le potentiel de l'huile végétale comme agent d'extraction et l'équation 4.1 permettrait de l'estimer.

$$\ln(q) = 0,360 \times \ln(C) + 2,832 \quad (\text{éq. 4.1})$$

$q$  = enlèvement des C10-C50 dans le sol (%)

$C$  = concentration en huile végétale utilisée dans la solution de lavage (g/l).

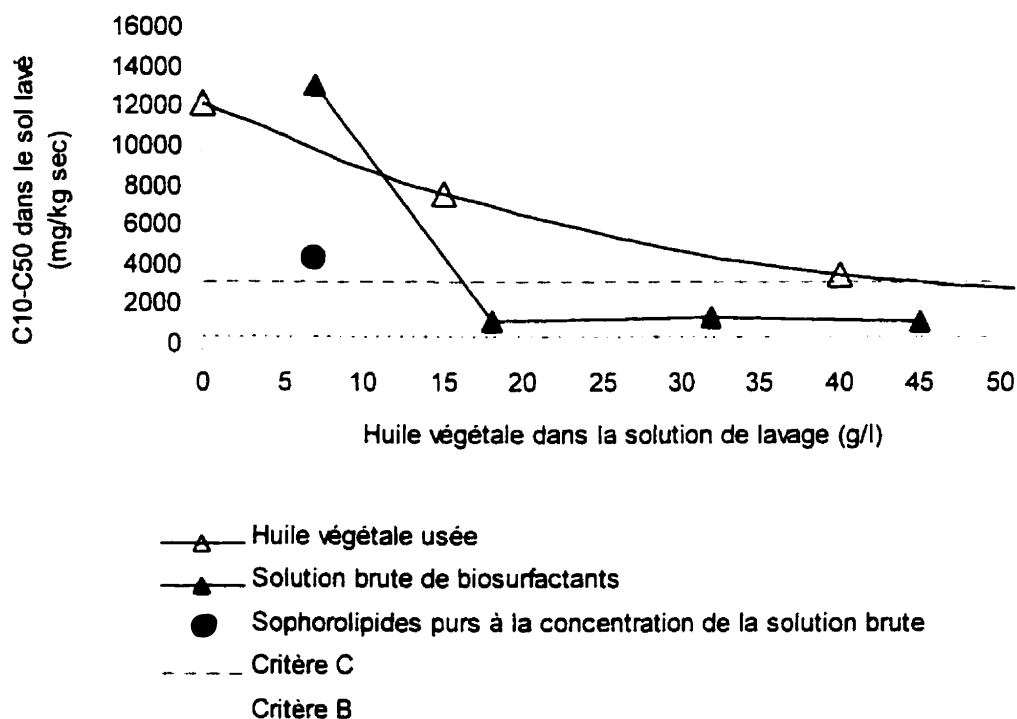


**Figure 4.5** Enlèvement des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> par des solutions à base d'huile de canola utilisée.

Ces résultats par rapport à l'huile végétale donnent une toute autre interprétation des résultats de lavage avec les solutions de biosurfactants. En effet, celle-ci contenait 45g/l d'huile végétale à son état brut (tableau 4.1). Afin d'évaluer la part d'efficacité attribuable aux sophorolipides et la part d'efficacité attribuable à l'huile végétale, un essai de lavage à partir de sophorolipides purifiés furent réalisés. Une seule concentration en sophorolipides fut étudiée pour ce lavage (impliquant des triplica) en raison des quantités limitées de biosurfactants purifiés disponibles.

La figure 4.6 montre une compilation des divers essais de lavage, et compare les solutions employées. Les critères B (700mg/kg sec) et C (3500mg/kg sec) sont

également tracés. L'abscisse représente la concentration en huile végétale dans le mélange et l'ordonnée les concentrations en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol lavé.



**Figure 4.6** Comparaison entre les solutions de lavage.

À des fins de comparaison, le point représentant le lavage aux sophorolipides purs (i.e. sans huile végétale dans le milieu) est placé vis-à-vis la concentration en huile végétale correspondante pour une solution de lavage brute. Ainsi, la solution de lavage brute diluée contenant 10g/l de sophorolipides se composait aussi de 7 g/l d'huile végétale ; la moyenne des résultats de lavages à 10g/l de sophorolipides purifiés fut indiquée vis-à-vis cette concentration, même si elle ne contient pas d'huile végétale. Cette valeur (4620mg/kg) comporte par ailleurs 3000mg/kg de non-détectés et représente la valeur maximale possible



(le minimum étant 1720 mg/kg). En effet, les analyses pour cette série furent fractionnées pour les quatre plages d'hydrocarbures (non indiqué) et la limite de détection fut de 1000mg/kg pour chaque plage (mais pour les autres analyses indiquées, elle fut de 100mg/kg). Suivant cette marge d'incertitude, les trois solutions de lavage étudiées permettent, à des concentrations différentes, d'atteindre la plage B-C de restauration des sols. Mais les solutions de biosurfactants furent légèrement plus efficaces.

Il semble qu'à faible concentration en sophorolipides (10g/l), l'huile végétale dans le milieu de lavage annule les effets de la présence des surfactants puisque ceux-ci employés seuls à cette concentration permettent de laver efficacement le sol. L'explication précédente quant à la valeur effective de la CMC en présence d'huile végétale semble donc étayée par les résultats de lavages aux sophorolipides purs. Mais à concentrations plus élevées en huile végétale (et conséquemment, en sophorolipides), le fait de ne pas purifier les surfactants ne semble pas négatif. De plus, pour des concentrations en huile végétale variant entre 18g/l et 45g/l, la solution de biosurfactants fut plus efficace en terme d'enlèvement des  $C_{10}$ - $C_{50}$  que l'huile végétale employée seule. L'écart entre les deux solutions de lavage se résorbe cependant au fil de l'augmentation en huile végétale en solution.

### 4.3. CONCLUSIONS SUR LES LAVAGES

---

D'une part, la faisabilité du lavage en mode cuvée d'un sable ( $\varnothing_{\text{particules}} < 1\text{mm}$ ) contaminé à partir de sophorolipides non purifiés fut démontrée. Les bouillons bruts de production de sophorolipides produits à partir de rejets industriels ont permis de retirer 89% des  $C_{10}$ - $C_{50}$  du sol et d'atteindre la plage B-C de restauration pour les sols. Cette efficacité de lavage fut obtenue pour des solutions de biosurfactants diluées à 60% (30g/l de sophorolipides, 18g/l d'huile végétale) et employées à 21°C. À plus forte dilution, une baisse importante d'efficacité fut observée. Même si ces concentrations sont au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), il est possible que la présence d'huile végétale dans le milieu repousse la valeur effective de la CMC, ce qui expliquerait la diminution d'efficacité. Enfin, les interférences causées par la présence de résidus de lavage dans les sols peuvent surestimer la concentration réelle en hydrocarbures pétroliers dans le sol.

D'autre part, l'huile de canola ayant servi à la friture des croustilles (rejet industriel) s'est révélée comme un excellent solvant pour la restauration du sable contaminé aux hydrocarbures pétroliers, pour lequel près de 88% des contaminants furent retirés avec une solution à 120g/l d'huile. Cependant, le transfert des contaminants dans ce solvant pourrait être limité par la diffusion dans les pores ou par la thermodynamique. Dans ce cas, l'efficacité de l'huile végétale pourrait être décrite par une relation logarithmique empirique reliant la concentration en solvant (huile) et le pourcentage d'enlèvement des contaminants.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS

Les résultats obtenus au cours de cette recherche ont démontré la faisabilité d'une production de biosurfactants par *Candida bombicola* ATCC 22214 pouvant répondre aux exigences industrielles. En effet, une production à grande échelle de près de 75g/l fut obtenue en milieu non stérile, à partir de rejets industriels, pour un rendement en biosurfactants de plus de 0,54g/g par rapport aux deux substrats. Les biosurfactants produits par la levure, un mélange de sophorolipides, furent ainsi synthétisés à partir de mélasse non raffinée et d'huile végétale provenant de l'industrie des croustilles n'ayant subi aucun traitement de purification. Ces deux produits sont disponibles actuellement à 0,112\$ CDN/kg et 0,04\$ CDN/kg, respectivement.

La substitution dans le milieu de production de l'huile végétale pure par de l'huile de canola usée n'eût pas d'effet significatif sur la production, mais la présence de composés polymérisés dans l'huile (ayant subi de hautes températures lors de la friture) pourrait entraver son utilisation par les micro-organismes. Ainsi, plus de 40% de l'huile incorporée est demeurée non consommée en fin de production en réacteur. Ce facteur pourrait être contourné en laissant décanter les particules d'huile végétale solide (polymérisée) avant son utilisation dans le milieu de production. Mais il serait aussi utile de réaliser des productions avec de moins fortes concentrations d'huile végétale, puisque celle-ci semble entraver l'efficacité des biosurfactants lors des lavages de sol à partir d'une solution brute.

Le remplacement du glucose pur par de la mélasse non raffinée comme substrat hydrophile présente plusieurs avantages. En effet, cette mélasse possède un

fort pouvoir tampon qui permet le maintien du pH de production à des valeurs optimales durant la production. De plus, elle apporte suffisamment de composés azotés pour éliminer l'urée (source d'azote) du milieu de production initial. Cependant, la mélasse semble, comme l'huile usée, contenir des composés plus difficilement accessibles aux micro-organismes, ce qui signifie une perte d'efficacité en terme d'intrants et d'extrants. D'un autre côté, ces concentrations résiduelles d'huile végétale et de mélasse dans la solution de biosurfactants brute pourraient montrer leur utilité en tant que nutriments dans la solution de lavage usée qui serait traitée par voie biologique. Il ne serait ainsi peut-être pas nécessaire d'ajouter d'autres nutriments au milieu pour un traitement en réacteur, par exemple. Enfin, si la mélasse non raffinée présente plusieurs avantages, la flore microbienne qu'elle contient au départ entrave le maintien de *Candida bombicola* dans le milieu de culture et des productions successives de biosurfactants à partir d'inoculum âgés. Il s'agit alors de comparer les avantages entre la stérilisation d'un inoculum à chaque production et la stérilisation de la mélasse pour plusieurs productions successives (où une contamination est tout de même probable). Mais puisque la contamination provient de la mélasse, l'inoculum pourrait être formulé à base de glucose ou de sucre inverti et non stérilisé.

Lors de la production de sophorolipides, il fut démontré que la température du milieu peut être maintenue, par le biais d'une simple isolation et sans contrôle externe, dans une plage favorable à la croissance des micro-organismes et à la production de biosurfactants. Combiné à l'emploi de mélasse, le mode de production étudié ne nécessitait donc ni contrôle de température, ni contrôle de pH.

La concentration micellaire critique du mélange de sophorolipides purifié fut mesurée à 25 mg/l, comparativement à des valeurs rapportées de 60mg/l (Hommel, 1990) et de 82mg/l (Cooper et Paddock, 1984). Lorsque la solution de biosurfactants est employée brute, il semble que l'huile végétale résiduelle qu'elle contient occupe elle-même les micelles et repousse la valeur effective de la CMC.

Le lavage d'un sable fin à moyen à l'aide des solutions brutes de production de sophorolipides a démontré leur efficacité à retirer les contaminants. Les solutions de biosurfactants diluées jusqu'à une concentration de 30g/l en sophorolipides (18g/l d'huile végétale résiduelle) ont permis de restaurer le sol jusqu'à la plage B-C des critères du Ministère de l'environnement et de la faune. Les concentrations mesurées dans le sol après lavage furent de 1500mg/kg sec, par rapport à une contamination initiale de 13 400mg/kg en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> (89% d'enlèvement). Mais ces concentrations sont vraisemblablement surestimées, en raison des interférences liées à la présence d'huile végétale résiduelle dans les échantillons de sol lavés. Les solutions se sont donc montrées plus efficaces que le Witconol SN-70, un surfactant synthétique, pour lesquels les conditions de lavages étaient optimales. Ce dernier permettait de restaurer le sol jusqu'à 2010mg/kg.

En raison de la nature biologique des solutions de biosurfactants, il est recommandé de poursuivre les essais, mais en se concentrant d'abord sur le traitement des solutions de lavage et du polissage du sol lavé, le cas échéant. Si les résultats sont encourageants, alors les efforts pourront se concentrer sur l'amélioration de la production et les modifications suggérées ci-haut. Enfin, il est important de signaler que les solutions brutes de sophorolipides ne peuvent

être envisagées pour un procédé de lavage *in situ* en raison de la forte concentration en biomasse et résidus qui bloqueraient les pores dans le sol.

Pour d'autres applications, les sophorolipides pourraient être produits en suivant la piste de la présente recherche, puisqu'ils montrent les mêmes caractéristiques que ceux produits en conditions pures. Dans ce cas, il faudrait élaborer une technique de récupération simple, comme par exemple laisser décanter la solution pour récupérer les sophorolipides de formes lactone (SL-1) qui sont recherchés pour leurs propriétés hydratantes et favorisent les émulsions de type eau/huile (*w/o*).

Concernant le lavage de sol, bien que les biosurfactants se soient montrés efficaces, l'huile végétale usée employée seule a permis de retirer la même quantité de contaminants du sol. Ainsi, elle agit comme solvant lourd pour l'extraction des contaminants hydrophobes. D'après les résultats d'analyses fractionnées, elle agit sur toutes les plages d'hydrocarbures, quoique cela soit moins évident pour la plage des C<sub>40</sub>-C<sub>50</sub>. De plus, il semble y avoir une relation mathématique logarithmique reliant la concentration en huile végétale dans la solution de lavage et le pourcentage d'enlèvement des contaminants sur un sol donné.

Comme l'huile végétale usée peut être facilement obtenue à prix très modique et qu'elle est vraisemblablement biodégradable, des essais de lavage supplémentaires et des essais de dégradation précis généreraient des résultats sans doute très intéressants. D'ailleurs, une brève analyse économique, permet d'évaluer le coût de lavage à la tonne associé à l'agent extactant, ici l'huile végétale usée. À des fins de comparaisons avec l'évaluation de la part du coût

de traitement associé à l'achat de surfactants synthétique (section 1.3.1.7 du chapitre I), les mêmes paramètres ont été utilisés. Ainsi, on calcule que pour une solution de lavage concentrée à 80 g/l d'huile végétale (ce qui permet d'atteindre la plage B-C de restauration, avec 2170 mg/kg de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol lavé), les coûts associés à l'agent de lavage varient de 25 \$/tonne à 50 \$/tonne, selon la proportion de sable dans le sol. Ces coûts tiennent compte de quatre cycles de lavages pour une concentration à 15 % (p/v) en sol. Cette évaluation n'est qu'indicative du potentiel de l'huile végétale, car les conditions de lavages n'ont pas été optimisées. Par exemple, il est possible que dès le premier cycle de lavage, les contaminants aient été retirés, ce qui réduirait encore considérablement le coût de lavage, qui passeraient à 7 \$/tonne pour un sol à 40 % de sable et à 15 \$/tonne pour un sol à 80 % de sable.

Puisque l'huile végétale supporte de très hautes températures, il serait probablement avantageux de faire des lavages à plus de 90°C. L'augmentation de solubilité et la baisse de viscosité qui seraient entraînées pourraient favoriser la diffusion du solvant (l'huile) dans les pores et la solubilisation des contaminants dans le mélange. D'autant plus que la haute température fait fondre les composés polymérisés de l'huile végétale usée, ce qui pourrait la rendre plus efficace. En contrepartie, il y aurait risque de "tuer" le sol, un facteur à considérer si un traitement en biopile est envisagé comme polissage. Des essais de lavages en colonne ne sont pas recommandés, en raison des risques de blocage causés par l'huile. Par conséquent, les essais devraient être réalisés en mode cuvée, mais avec échantillonnage après chaque cycle. Enfin, il est essentiel de modifier les méthodes d'analyses des hydrocarbures ou d'évaluer l'apport de l'huile végétale dans la contamination finale mesurée en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>.

La possibilité de chauffer l'huile végétale et son usage comme agent extractant devraient d'ailleurs être étudiés à d'autres fins que le lavage de sol, par exemple pour le nettoyage de transformateurs contaminés aux BPC qui sont actuellement extraits avec du perchloroéthylène (aussi nommé tétrachloroéthylène), un des contaminant prioritaire de l'U.S.EPA.

Enfin, si la désorption des contaminants à l'aide d'huile végétale est limitée par la thermodynamique (constantes d'équilibre), il pourrait être avantageux de combiner le lavage à l'huile et celui aux biosurfactants. En effet, une première série de lavage à l'huile permettrait de retirer la majeure partie de la contamination par le biais de l'affinité entre l'huile et les contaminants. Ensuite, un lavage aux biosurfactants permettrait de solubiliser ou de mobiliser les contaminants résiduels inaccessibles à l'huile par le biais des micelles.

Tel qu'annoncé au début de cet ouvrage, la recherche dont les résultats sont présentés ici a exploré plusieurs pistes parallèles. Les résultats obtenus furent positifs et ont étayé l'hypothèse de recherche. De surcroît, les essais avec l'huile végétale ont ouvert une autre avenue dont le potentiel était sous estimé. Conséquemment, plusieurs voies peuvent être envisagées pour des recherches à venir, dont les résultats présentés ici pourront servir de repères.



## LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDUL, A. S., GIBSON, T.L. et RAI, D.N. (1990). "Selection of Surfactants for the Removal of Petroleum Products from Shallow Sandy Aquifers." Ground Water 28(6): 920-926.

ABDUL, S. A. et ANG, C.C. (1994). "In Situ Surfactant Washing of Polychlorinated Biphenyls and Oils from a Contaminate Field Site: Phase II Pilot Study." Ground Water 32(5): 727-734.

ALEXANDER, M. (1994). NAPLS and Compounds with Low Water Solubility. Biodegradation and Bioremediation. A. Press. San Diego CA, Academic Press Limited: 131-148.

ALEXANDER, M. (1994). Sorption. Biodegradation and Bioremediation. A. Press. San Diego, CA, Academic Press Limited: 114-130.

ANG, C.C. et ABDUL, S.A. (1991). "Aqueous Surfactant Washing of Residual Oil Contamination from Sandy Soil." Ground Water Monitoring Review XI(2): 121-127.

API (1995). Monthly Statistical Report. Washington, DC, American Petroleum Institute.

ASMER, H.-J., LANG, S., WAGNER, F., et WRAY, V. (1988). "Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids." IAOCS 65(9): 1460-1466.

BAI, G., BRUSSEAU, M. et MILLER, R. (1997). "Biosurfactant-Enhanced Removal of Residual Hydrocarbon from Soil." Journal of Contaminant Hydrology 25: 157-170.

BANAT, I. M. (1995). "Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A review." Bioresource Technology 51: 1-12.

BERKOWITZ, J.B. et FARKAS, A.L. (1992). "Commercializing Innovative Cleanup Technologies." Env. Sci. Technol. 26(2): 247.

BHANDARI, A., DOVE, D.C., et NOVAK, J.T. (1994). "Soil Washing and Biotreatment of Petroleum-Contaminated Soils." Journal of Environmental Engineering **120**(5 (September/October)): 1151-1169.

CLARKE, A. N., MUTCH, R.D. WILSON, D.J. et OMA, K.H. (1992). "Design and Implementation of Pilot Scale Surfactant Washing/Flushing Fluid Technologies Including Surfactant Reuse." Wat. Sci. Tech. **26**(1-2): 127-135.

COOKSON, J. T. (1995). Bioremediation Engineering : Design and Application. New York, NY.

COOPER, D.G., et PADDOCK, D.A. (1984). "Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*." Applied and Environmental Microbiology **47**(1): 173-176.

COOPER, D.G. et ZAJIC, J.E. (1980). "Surface-Active Compounds from Microorganisms." Adv. Appl. Microbiol. **26**: 229-253.

DAVILA, A.-M., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1992). "Kinetics and Balance of a Fermentation Free from Product Inhibition : Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*." Appl. Microbiol. Biotech. **38**: 6-11.

DAVILA, A. M., MARCHAL, R., MONIN, N. et VANDECASTEELE, J.P. (1993). "Identification and Determination of Individual Sophorolipids in Fermentation Products by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection." Journal of Chromatography **648**(1993): 139-149.

DAVILA, A.-M., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1994). "Sophorose Lipid Production from Lipidic Precursors : Predictive Evaluation of Industrial Substrates." Journal of Industrial Microbiology **13**: 249-257.

DAVILA, A.-M., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1997). "Sophorose Lipid Fermentation with Differentiated Substrate Supply for Growth and Production Phases." Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**: 496-501.

DAVIS, K. L., REED, G.D. et WALTER, L. (1995). A Comparative Cost Analysis of Petroleum Remediation Technologies, Battelle Press.

DESAI, J.D., et DESAI, A.J. (1993). Production of Biosurfactants. BIOSURFACTANTS-Production-Properties-Applications. N. KOSARIC, University of Western Ontario. **48**: 65-92.

DESAI, J.D. et BANAT, I. (1997). "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**(1): 47-64.

DESCHÊNES, L., LAFRANCE, P. et VILLENEUVE, J.-P. (1995). "The Effect of an Anionic Surfactant on the Mobilization and Degradation of PAHs in a Creosote-Contaminated Soil." Hydrological Science - Journal - des sciences hydrologiques **40**(4): 471-484.

DESPHANDE, M., et DANIELS, L. (1995). "Evaluation of Sophorolipids Biosurfactant Production by *Candida Bombicola* Using Animal Fat." Bioresource Technology **54**: 143-150.

DIALLO, K.S., ABRIOLA, L.M. et WEBER, W.J.Jr. (1994). "Solubilization of Nonaqueous Phase Liquid Hydrocarbons in Micellar Solutions of Dodecyl Alcohol Ethoxylates." Environ, Sci. Technol. **28**(11): 1829-1837.

DIFCO LABORATORIES. DIFCO MANUAL, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. Detroit, MI: 11131-1132.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. et SMITH, F. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry **28**(3): 350-356.

EDWARDS, D.A., LUTHY, R.G., et LIU, Z. (1991). "Solubilization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Micellar Nonionic Surfactant Solutions." Environ. Sci. Technol. **25**: 127-133.

EDWARDS, D.A., LIU, Z. et LUTHY, R.G. (1992). "Interactions Between Nonionic Surfactant Monomers, Hydrophobic Organic Compounds and Soil." Wat. Sci. Techn. **26**(1-2): 147-158.

ELLIS, W.D., PAYNE, J.R. et McNAAB, G.D. (1985). Treatment of Contaminated Soils with Aqueous Surfactants. Cincinnati, OH, U.S.EPA.

FALATKO, D. M. et NOVAK, J.T. (1992). "Effects of Biologically Produced Surfactants on the Mobility and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons." Water Environment Research **64**(2): 163-169.

FELDER, R.M., et ROUSSEAU, R.W. (1986). Elementary principles of chemical processes. New York, NY.

FIECHTER, A. (1992). "Biosurfactants : Moving Towards Industrial Application." TIBTECH **10**: 208-217.

FIEHLER, K., ALBRECHT, A., RASCH, D. et RAU, U. (1997). "Kontinuierliche Produktion von Sophorolipiden mit *Candida bombicola* ATCC 22214." Fett/Lipid **99**(1): 19-24.

FREEMAN, H.M., et HARRIS, E.F., Ed. (1995). Hazardous Waste Remediation - Innovative Treatment Technologies. Lancaster, PA.

FRIED, B. et SHERMA, J. (1994). Thin-Layer Chromatography: techniques and applications, Marcel Dekker Inc.

FRIED, B. et SHERMA, J. Lipids (chapter 21, HAndbook of TLC, 2nd edition). Handbook of Thin-Layer Chromatography: Second Edition, Revised and Expanded. J. S. a. B. Fried, Marcel Dekker Inc.: 683-714.

GEE, G.W., et BAUDER, J.W. (1986). Particle-Size Analysis. A. S. o. Agronomy. Madison, WI: 383-412.

GEORGIU, G., LIN, S.-C. et SHARMA, M.M. (1992). "Surface-Active Compounds from Microorganisms." Biotechnology **10**(January): 60-65.

GERSON, D.F. (1993). Biophysics of Microbial Surfactants. BIOSURFACTANTS-Production-Properties-Applications. N. KOSARIC, University of Western Ontario. **48**: 271-285.

GHURYE, G.L., et VIPULANANDAN, C. (1994). "A Practical Approach to Biosurfactant Production Using Nonaseptic Fermentation of Mixed Cultures." Biotechnology and Bioengineering **44**: 661-666.

GLASS, D.J., RAPHAEL, T., VALO, R. et VAN EYK, J. (1995). International Activities in Bioremediation: Growing Markets and Opportunities. Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. J. A. K. e. J. R. Robert E. Hinchee, Battelle Press. 3.

GORIN, P.A., SPENCER, J.F.T. et TULLOCH, A.P. (1961). "Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose from *Torulopsis magnoliae*." Can. J. Chem. **39**: 846-895.

GUERRA-SANTOS, L., KAEPELLI, O. et FIECHTER, A. (1984). "*Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source." Appl. Environ. Microbiology **48**: 301-305.

HAFERBURG, D., HOMMEL, R., CLAUS R. et KLEBER, H.-P. (1986). "Extracellular Microbial Lipids as Biosurfactants." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **33**: 53-93.

HART, H. et CONIA, J.-M. (1987). Introduction a la chimie organique. Paris.

HARVEY, S., ELASHVILI, I., VALDES, J.J., KAMELY, D. et CHAKRABARTY, A.M. (1990). "Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant." Biotechnology **8**(March): 228-230.

HAWRYSH, Z.J. (1990). Stability of Canola Oil. Canola and Rapeseed : Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. F. Shahidi. New York, NY, Van Nostrand Reinhold: 99-122.

HEALY, M.G., DEVINE, C.M. et MURPHY, R. (1996). "Microbial Production of Biosurfactants." Resources, Conservation and Recycling **18**: 41-57.

HOMMEL, R.K. (1990). "Formation and Physiological Role of Biosurfactants Produced by Hydrocarbon-Utilizing Microorganisms." Biodegradation **1**: 107-119.

KACHHOLZ, T. et SHLINGMANN, M. (1987). Possible Food and Agricultural Application of Microbial Surfactants: An Assessment. Biosurfactants and Biotechnology. N. KOSARIC, CAIRNS, W.L. et GRAY, N.C.C. New York, NY. **25**: 185-191.

KLEKNER, V., KOSARIC, N. et ZHOU, Q.-H. (1991). "Sophorose Lipids Produced from Sucrose." Biotechnology Letters **13**(5): 345-348.

KOMMALAPATI, R.R. et ROY, D. (1997). "Bioenhancement of Soil Microorganisms in Natural Surfactant Solution. III. Effect of Hexachlorobenzene." J. Environ. Sci. Health **A32**(6): 1763-1779.

KOSARIC, N., CAIRNS, W.L., GRAY, N.C.C., STECHEY, D. et WOOD, J. (1984). "The Role of Nitrogen in Multiorganism Strategies for Biosurfactant Production." IAOCS **61**(11): 1735-43.

KOSARIC, N., CAIRNS, W.L., et GRAY, N.C.C., Ed. (1987). Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant Science Series. New York.

KOSEOGLU, S. S. et LUSAS, E.W. (1990). Hydrogenation of Canola Oil. Canola and Rapeseed : Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. F. Shahidi. New York, NY, Van Nostrand Reinhold: 123-148.

KOULOHERIS (1989). "Surfactants Important Tools in Chemical Processin." Chemical Engineering(Oct.): 130-136.

LEE, K. H. et KIM., J.H. (1993). "Distribution of Substrates Carbon in Sophorose Lipid Production by *Torulopsis bombicola*." Biotechnology Letters **15**(3): 263-266.

LEGROS, R., PANNETON, C., ROBERGE, F. et SAMSON, R. (1995). Projet sur le lavage des sols contaminés aux hydrocarbures et aux métaux. Montréal (Québec), Centre de développement technologique, École Polytechnique de Montréal.

LIN, S.-C. (1996). "Biosurfactants: Recent advances." J. Chem. Tech. Biotechnol. **66**: 109-120.

LIN, S.C., GOURSAD, J.-C., KRAMER, P.J., GEORGIU, G. et SHARMA, M.M. (1990). Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. Microbial Enhancement of Oil Recovery - Recent Advances. E. C. Donaldson. Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 219-226.

MACKAY, D. et PATERSON, S. (1981). "Calculating Fugacity." Environmental Science and Technology **15**(9): 1006-1014.

MALCOMSON, L.J., VAISEY-GENSER, M., PRZYBYLSKI, R., RYLAND, D., ESKIN, N.A.M. et ARMSTRONG, L. (1996). "Characterization of Stored Regular and Low-Linolenic Canola Oils at Different Levels of Consumer Acceptance." JAOCS 73(9): 1153-1160.

MARGARITIS, A., ZAJIC, J.E. et GERSON, D.F. (1979). "Production and Surface-Active Properties of Microbial Surfactants." Biotechnology and Bioengineering XXI: 1151-62.

MARTEL, R. et GÉLINAS, P.J. (1996). "Surfactant Solutions Developed for NAPL Recovery in Contaminated Aquifers." Ground Water 34(1): 143-154.

MATTEI, G., et BERTRAND, J.-C. (1985). "Production of Biosurfactants by a Mixed Bacteria Population Grown in Continuous Culture on Crude Oil." Biotechnology Letters 7(4): 217-222.

MEF (1995). Pour Une Gestion Durable et Responsable de nos Matières Résiduelles. Québec, Ministère de l'Environnement et de la Faune.

MEF (1996). Projet de politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Québec, Service des lieux contaminés, Direction des politiques du secteur industriel, Ministère de l'environnement et de la faune.

MEUNIER, P. (1994). "L'achat d'un terrain contaminé." Envirotech (Jan-fév.): 24.

MIHELICIC, J. R., PRITSCHOW, A. et LUEKING, D. (1995). "Uptake of Dissolved and Oil Phase Organic Chemicals by Bacteria." GWMR (summer 95): 100-106.

MILLER, R. M. et ZHANG, Y. (1997). Measurement of Biosurfactant-Enhanced Solubilization and Biodegradation of Hydrocarbons. Bioremediation Protocols. D. S. H. P. Inc. Totowa, NJ. 2: 59-66.

MISRA, M., et MEHTA, R.K. (1995). "Remediating Heavy Metals, Radionuclides, and Organic Pollutants from Soils." IOM(sep): 45-53.

PARK, J.-W. et JAFFÉ, P.R. (1995). "Phenanthrene Removal From Soil Slurries With Surfactant-Treated Oxides." Journal of Environmental Engineering(june): 430-437.

PARKINSON, M. (1985). "Bio-Surfactants." Biotechnology Advances 3: 65-83.

PAVIA, D.M., LAMPMAN, G.M., et KRIZ, G.S. (1988). Thin-Layer Chromatography (technique 11). Introduction to Organic Laboratory Techniques: Third Edition. Washington, Saunders College: 615-629.

RAGHAVAN, R., COLES, E. et DIETZ, D. (1990). Cleaning Excavated Soil Using Extraction Agents: A State-of-the-Art Review. Cincinnati, OH, Risk Reduction Engineering Laboratory, Research and Development, U.S.EPA.

RAU, U., MANZKE, C. et WAGNER, F. (1996). "Influence of Substrate Supply on the Production of Sophorose Lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214." Biotechnology Letters 18(2): 149-154.

REILING, H. E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L.H., HIRT, R., KAEPELLI, O. et FIECHTER, A. (1986). "Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology 51(5): 985-989.

REISINGER, H. J. (1995). Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons, Battelle Press.

RENNER, R. (1997). "European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate." Environmental Science & Technology 31(7): 316-320.

ROBERT, M., MERCADÉ, M.E., BOSCH, M.P., PARRA, J.L. ESPUNY, M.J., MANRESA, M.A. et GUINEA, J. (1989). "Effect of the Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1." Biotechnology Letters 11(12): 871-874.

ROBINSON, K.G., GHOSH, M.M. et SHI, Z. (1996). "Mineralization Enhancement of Non-Aqueous Phase and Soil-Bound PCB Using Biosurfactant." Wat. Sci.Tech 34(7-8): 303-309.

ROSEN, M.J. (1989). Emulsification by Surfactants. Surfactants and Interfacial Phenomena. J. W. a. Sons. New York: 225-229.

ROSEN, M.J. (1989). Foaming and Antifoaming by Aqueous Solutions. Surfactants and Interfacial Phenomena. J. W. a. Sons. New York: 201-223.



ROSEN, M.J. (1989). Solubilization by Solutions of Surfactants: Micellar Catalysis. Surfactants and Interfacial Phenomena. J. W. a. Sons. New York: 123-147.

ROUSE, J.D., SABATINI, D.A., DEEDS, N.E. et BROWN, E. (1995). "Micellar Solubilization of Unsaturated Hydrocarbon Concentrations as Evaluated by Semiequilibrium Dialysis." Environ. Sci. Technol. **29**: 2484-2489.

ROY, D., KOMMALAPATI, R.R., MANDAVA, S.S., VALSARAJ, K.T., et CONSTANT, W.D. (1997). "Soil Washing Potential of a Natural Surfactant." Environmental Science & Technology **31**(3): 670-675.

SAMSON, R. (1994). Biorestauration des Sites Contaminés : Les Technologies Ex Situ. Sainte-Foy (Québec), Centre Québécois de Valorisation de la Biomasse.

SELVAKUMAR, A., MA, J., RAY, A. et BORST, M. (1995). "How to Choose the Right Surfactant, Screen Various Products to Find the Best Solution." Soils(Mars): 32-36.

SHIAU, B.-J., SABATINI, D.A. et HARWELL, J.H. (1995). "Properties of Food Grade (Edible) Surfactants Affecting Subsurface Remediation of Chlorinated Solvents." Environ. Sci. Technol. **29**: 2929-2935.

SIMS, R. (1990). "Soil Remediation Techniques at Uncontrolled Hazardous Waste Sites - A Critical Review." J. Air & Waste Management Association(40): 704-732.

SONNTAG, R. E. et VAN WYLEN, G.J. (1992). Introduction to Thermodynamics : Classical and Statistical. New York, NY.

SPENCER, J. F. T., SPENCER, D.M. et TULLOCH, A.P. (1979). "Extracellular Glycolipids of Yeasts." Economic Microbiol. **3**: 523-540.

SYLDATK, C. et WAGNER, F. (1987). Production of Biosurfactants. Biosurfactants and Biotechnology. N. Kosaric, Cairns, W.L., et Gray, N.C.C. New York. **25**: 89-120.

TABLE DE CONCERTATION SUR LES LIEUX CONTAMINÉS. (1993). Stratégie de Développement de l'Industrie Québécoise de la Protection des Sols et de la Réhabilitation des Lieux Contaminés, Grappe de l'industrie de l'environnement.

THANGAMANI, S., et SHREVE, G.S. (1994). "Effect of Anionic Biosurfactant on Hexadecane Partitioning in Multiphase Systems." Environ. Sci. Technol. **28**(12): 1993-2000.

THE HAZARDOUS WASTE CONSULTANT. (1993). "A Comparison of Commercial Soil Washing Techniques." The Hazardous Waste Consultant(January/February): 1.14-1.18.

TREYBAL, R. E. (1980). Mass-Transfer Operations. New York, NY.

TULLOCH, A. P., SPENCER, J.F.T. et GORIN, P.A.J. (1962). "The Fermentation of Long-Chain Compounds by *Torulopsis magnoliae*. Structures of the Hydroxy Fatty Acids Obtained by Fermentation of Fatty Acids and Hydrocarbons." Can. J. Chem. **10**: 1326-1338.

U.S.EPA (1989). Innovative Treatment Technology Soil Washing. Cincinnati, OH, Office of Solid Waste And Emergency Response, U.S.EPA.

U.S.EPA (1991). Innovative Treatment Technologies - Overview and Guide to Information Sources. Washington, DC, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Information Office, U.S.E.P.A.

U.S.EPA (1992). Bergmann USA Soil/Sediment Washing Systems. Cincinnati, OH, EPA , Risk Reduction Engineering Laboratory.

U.S.EPA (1993). Toronto Harbour Commisioners Project, U.S.EPA.

U.S.EPA (1994). VISITT -Vendor Information System for Innovative Treatment Technologies. Washington, DC, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Information Office, U.S.EPA.

U.S.EPA (1995). Introduction to EPCRA/SARA Title III. WA, D.C., EPCRA, Office of Pollution Prevention and Toxics, U.S.EPA.

U.S.EPA (1996). SITE Technology Profiles, Ninth Ed. Cincinnati, OH, National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S.EPA.

U.S.EPA (1997). Cleaning Up the Nation's Waste Sites : Markets and Technology Trends. Washington, DC, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Information Office, U.S.EPA.

U.S.EPA (1998). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, version 3.0. Washington, DC, Federal Remediation Roundtable, U.S.EPA.

VAN BENSCHOTEN, J.E., MATSUMOTO, M.R. et YOUNG, W.H. (1997). "Evaluation and Analysis of Soil Washing for Seven Lead-Contaminated Soils." Journal of Environmental Engineering **123**(3): 217-224.

VAN DYKE, M. I., LEE, H. et TREVORS, J.T. (1991). "Applications of Microbial Surfactants." Biotech. Adv. **9**: 241-252.

VANDEMARK, P.J., et BATZING, B.L. (1987). The microbes : an introduction to their nature and importance. Menlo Park, CA.

VIPULALANANDAN, C., WILLSON, R. et GHURYE, G. (1995). Effect of Clay and Biosurfactant on the Biodegradation of Toluene. Proceedings of the Specialty Conference on Geotechnical Practice in Waste Disposal. Part 2 (of 2)., New Orleans, LA, USA.

WEST, C. C. et HARWELL, J.H. (1992). "Surfactants and Subsurface Remediation." Environ. Sci. Technol. **26**(12): 2324-2330.

WILLERVAL, B., BOISSEAU, Y. et SERRES-COUSINÉ, H., Ed. (1988). Petit Larousse illustré 1989. Paris.

ZAJIC, J.E. et SEFFENS, W. (1984). "Biosurfactants." CRC Crit. Rev. Biotech. **1**: 87-107.

ZHANG, Y. et MILLER, R.M. (1992). "Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant)." Applied And Environmental Microbiology **58**(10): 3276-3282.

ZHOU, Q.-H., KLEKNER, V., et KOSARIC, N. (1992). "Production of Sophorose Lipids by *Torulopsis bombicola* from Safflower Oil and Glucose." IAOCS 69(1): 89-91.

ZHOU, Q.-H., et KOSARIC, N. (1993). "Effect of Lactose and Olive Oil on Intra- and Extracellular Lipids of *Torulopsis bombicola*." Biotechnology Letters 15(5): 477-482.

ZHOU, Q.-H., et KOSARIC, N. (1995). "Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*." IAOCS 72(1): 67-71.

## ANNEXE A

### PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

Milieu nutritif pour le maintien de la souche <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 .....	157
Production de biosurfactants en culture pure par <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 .....	159
Méthode d'extraction des sophorolipides (biosurfactants), de la biomasse et de l'huile résiduelle du milieu de production .....	166
Analyse des sucres en phase aqueuse par méthode colorimétrique au phénol .....	173
Quantification des sophorolipides (biosurfactants) par méthode indirecte : analyse du glucose dans la phase organique .....	177
Identification des sophorolipides par chromatographie en couche mince (CCM) .....	181
Mesure de la tension de surface et détermination de la concentration micellaire critique ....	186
Vérification de la pureté du milieu de production de <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 .....	189
Lavages de sol en mode cuvée .....	192
Analyse des hydrocarbures pétroliers dans les sols .....	198



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3A	Pages:
Version: I	Date Début
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Titre: Milieu nutritif pour le maintien de la souche *Candida bombicola* ATCC 22214.  
Mots clés: milieu YM, levure, stérile

### 1. OBJECTIF(S)

Préparation des milieux favorables au maintien de la souche *Candida bombicola* ATCC 22214.

### 2. MATERIELS

- Petris stériles;
- Formule du milieu nutritif YM (Difco):

Ingrédients par litre de milieu

Bacto extrait de levure .....3 g  
Extrait de malt, Difco.....3 g  
Bacto peptone.....5 g  
Bacto dextrose.....10 g  
Bacto agar.....20 g

- Solution de HCl

### 3. METHODOLOGIE

Remarque: calculer environs 20 ml de milieu par pétis et prévoir que les pétis conservées à 4°C conserveront leurs propriétés pour environs 3 mois.

1. Dans un bécher de grandeur appropriée, mettre tous les ingrédients et dissoudre dans la moitié du volume d'eau distillée nécessaire.
2. Transvider le contenu dans une fiole jaugée et compléter au volume total avec de l'eau distillée.
3. Mesurer le pH (il devrait être d'environ 6,2) et l'ajuster à 4,0 avec du HCl.
4. Mettre le contenu dans un erlenmeyer (ne pas remplir à plus de 50% du volume du contenant), fermer avec un bouchon mousse et un papier d'aluminium, identifier et mettre à l'autoclave pour 20 minutes (liquides) à 121°C, 1 atmosphère.

Laisser refroidir à 45°C – 55°C (à l'air ou à l'aide d'un bain thermostaté).

5. Sous la hotte, identifier les pétris et mettre environ 20 ml de milieu stérile dans chacun.
6. Laisser refroidir sous la hotte sans les fermer : après environ 30 minutes, refermer les pétris et les entreposer dans un coin de la hotte pour 24 – 48 heures.
7. Entreposer les pétris dans un sac hermétique fermé, de façon à ce que le fond des pétris soit vers le haut (pour éviter l'évaporation de l'eau du milieu et le séchage des géloses), à 4°C.

#### 4. REFERENCES

DIFCO MANUAL, *Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*, Difco laboratories, 10<sup>ème</sup> édition, Detroit, Mi., Pp. 1131-1132.

#### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Pour préparer un milieu liquide, utiliser la même formule mais sans l'agar. Le milieu liquide ne devrait pas être conservé plus de 3 semaines à 4°C et ne devrait pas être utilisé si la solution est trouble (indice d'une croissance microbienne).

Les solutions sont de couleur beige.

#### 6. ANNEXES: MODIFICATIONS



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3B	Pages:
Version: 1	Date Début
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Titre:** Production de biosurfactants en culture pure par *Candida bombicola* ATCC 22214

**Mots clés:** Biosurfactants, *Candida bombicola* ATCC 22214, sophorolipides, glucose, huile végétale, erlenmeyers.

## 1. OBJECTIF(S)

Production de biosurfactants de type sophorolipides par la souche pure *Candida bombicola* ATCC 22214 (levure, anciennement sous le genre *Torulopsis*). Les paramètres suivis durant la production sont qualitatifs (couleur, émulsion, aspect) et quantitatifs : suivi de l'huile (PE#P3C), des sophorolipides (PE#P3C) et de la biomasse (PE#P3C), du glucose (PE#P3D), et suivi du pH (PSO#A4) et de la température.

## 2. MATERIELS

### 1. Inoculums de *Candida bombicola* :

- souche pure de *Candida bombicola* ATCC 22214 maintenue sur gélose nutritive YM (PE#P3A) qu'on transfère à tous les mois;
- boucle à inoculation, brûleur, hotte stérile;
- erlenmeyers stériles à chicanes de 1000 ml;
- 400 ml de milieu nutritif stérile YM (PE#P3A);
- bouchons mousse dia. 30mm;
- agitateur planaire et pince en acier inoxydable pour erlenmeyer de 1000 ml.
- papier d'aluminium.
- pipettes stériles de 10 ml;



## 2. Production de *Candida bombicola* ATCC 22214 en erlenmeyer d'un litre:

- Erlenmeyer à chicanes de 1000 ml (max 30% facteur de remplissage);
- Bêcher de 1 L pour préparer le milieu;
- Agitateur planaire et pinces en acier inoxydable;
- Bouchons de mousse;
- Sonde à pH;
- HCl ou NaOH pour l'ajustement du pH;
- Milieu nutritif de production des biosurfactants:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Anachemia, A.C.S.).....	0,1 %	.....1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (Anachemia, A.C.S.).....	0,5 %	.....5,0 g/l
FeCl <sub>3</sub> (Anachemia, A.C.S.).....	0,01 %	.....0,1 g/l ⇒ 0,17 g FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O
NaCl (Anachemia, A.C.S.).....	0,01 %	.....0,1 g/l
Extrait de levure (Becton Dickinson).....	0,4 %	.....4,0 g/l
Urée .....	0,1 %	.....1,0 g/l
Huile de canola <sup>1</sup> (100%pure, sans conservatif.Primo).....	10,5 %	.....105,0 g/l
Glucose <sup>2</sup> (Fisher Chemical).....	10,0 %	.....100,0 g/l

➡ ● **AJUSTER LE PH A 4,5** (NaOH ou HCl) avant d'autoclaver le milieu à 121°C, 1 atmosphère, durant 20 min.

<sup>1</sup>De grade alimentaire, sans conservatifs.

<sup>2</sup>Ajouter graduellement le glucose dans l'eau, pour éviter la formation d'un bloc qui se dissout difficilement. On peut également chauffer légèrement l'eau.

N.B. Glucose = Dextrose.

## 3. METHODOLOGIE

Deux cultures peuvent être préparées préalablement à l'inoculation du milieu de production (voir figure 1) afin d'initier une production avec des cellules jeunes en phase de croissance. Mais la production peut aussi débiter immédiatement avec un inoculum de 10 % qui est suffisamment fort pour soutenir une croissance élevée.

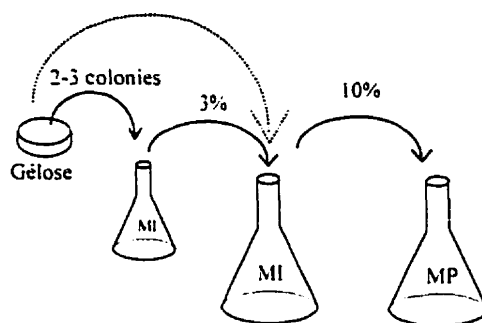


Figure 1: schématisation de la production en erlenmeyer

MI: milieu d'inoculation. MP : milieu de production

#### 1. Première culture

- Sous la hotte stérile, prélever 2 colonies de la levure sur une gélose.
- Inoculer 200 ml de milieu YM stérile et fermer avec un bouchon mousse.
- Recouvrir l'erlenmeyer avec du papier d'aluminium, qui agit comme isolant.
- Placer l'erlenmeyer sur un agitateur planaire à 200 rpm, T° ambiante, pour 48 hrs.

#### 2. Seconde culture

- Prélever de façon stérile 10 ml (inoculum de 3% v/v) de la culture de 48 hrs et inoculer 300 ml de milieu stérile liquide YM contenu dans un erlenmeyer (stérile) de 1000 ml à chicanes.
- Fermer avec un bouchon mousse et couvrir l'erlenmeyer de papier d'aluminium.
- Placer l'erlenmeyer sur un agitateur planaire à 200 rpm, T° ambiante, pour 24 hrs.

*N.B Si la production débute à la suite d'une seule culture, prélever 3 colonies maintenues sur gélose YM et suivre les étapes indiquées pour la seconde culture (en pointillés sur la figure 1).*

#### 3. Milieu de production (pour 300 ml)

- Dans un bêcher, débiter par la dissolution du glucose dans une partie de l'eau distillée nécessaire;
- Ajouter les éléments secs et agiter avec un barreau magnétique;
- Transvider dans un ballon jaugé de 300 ml ajouter l'huile végétale<sup>1</sup> ;

<sup>1</sup> On peut y aller par poids ou par volume, en mesurant la masse volumique de l'huile végétale utilisée à l'aide d'une pipette et de la balance analytique (prendre 10 mesures d'un même volume et faire la moyenne).  $\rho_{\text{huile canola}} \text{ (Primo)} \approx 0.87 \text{ g/ml}$ .

- Compléter le volume à 300 ml avec de l'eau distillée;
- Agiter et retransférer dans le b cher pour agiter avec le barreau magnétique;
- Calibrer la sonde à pH (PSO A4) et prendre une mesure du pH tout en maintenant l'agitation, pour ne pas laisser les 2 phases se séparer;
- Ajuster le pH à 4,5 si nécessaire avec du NaOH ou du HCl;
- Transférer dans un erlenmeyer à chicanes de 1000 ml et autoclaver 20 minutes à 121 C, 1 atmosphère.
- Laisser le milieu revenir à la température de la pièce avant d'inoculer.
- Prélever 30 ml de la culture de 24 heures et inoculer, sous conditions stériles, le milieu de production.
- Fermer avec un bouchon mousse et recouvrir de papier d'aluminium.
- Placer sur l'agitateur à température ambiante, à 200 rpm.

#### 4. REFERENCES

- COOPER, D.G. ET PADDOCK, D.A.. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 173-176.
- DESPHANDE, M., et DANIELS, Lacy (1995). Evaluation of Sophorolipids Biosurfactant Production by *Candida Bombicola* Using Animal Fat. *Bioresource Technology* 54: 143-150.
- ZHOU, Q.H., ET KOSARIC, N.. 1995. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida Bombicola*. *JAOCS* 72 (1): 67-71.
- ZHOU, Q.H., ET KOSARIC, N.. 1993. Effect of Lactose and Olive Oil on Intra- and Extracellular Lipids of *Torulopsis Bombicola*. *Biotechnology Letters* 15 (5): 477-482.
- ZHOU, Q.H., KLEKNER, V. ET KOSARIC, N.. 1992. Production of Sophorose Lipids by *Torulopsis Bombicola* from Safflower Oil and Glucose. *JAOCS* 69 (1): 89-91.

#### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

##### RÉSULTATS

- De façon qualitative, la couleur du bouillon passe rapidement (après 1 jour de production) au caramel-beige, avec une couche d'émulsion en surface. Après deux jours, l'apparence est plus laiteuse, de couleur sable, et la couche en émulsion est un peu plus fine (mousse compacte blanc cassé). Cette situation se maintient jusqu'à la fin de la production (8 jours ou plus).
- En raison du papier d'aluminium, la température du milieu monte à 27-30 C dès le premier jour et se maintient entre 25 C et 30 C durant toute la production. La température de croissance et de production de la levure étaient contrôlées à 30 C dans le protocole qui est suivi (Zhou et Kosric, 1995), mais est la température optimale est située entre 25 C (Davila *et al.*, 1997) et 27 C (Rau *et al.*, 1996) selon d'autres auteurs.

- Le pH de la solution descend rapidement à 2,9-3,2 (24 hrs) et demeure à ces valeurs jusqu'en fin de production (figure 2).

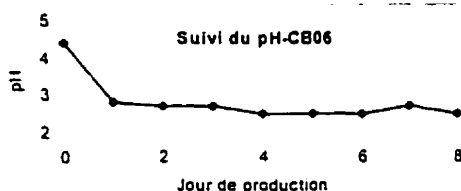


Figure 2. Suivi du pH lors d'une production en erlenmeyers de 1000 ml avec chicanes.

- Le suivi d'une production en erlenmeyers de 1000 ml avec chicanes est présenté à la figure 3:

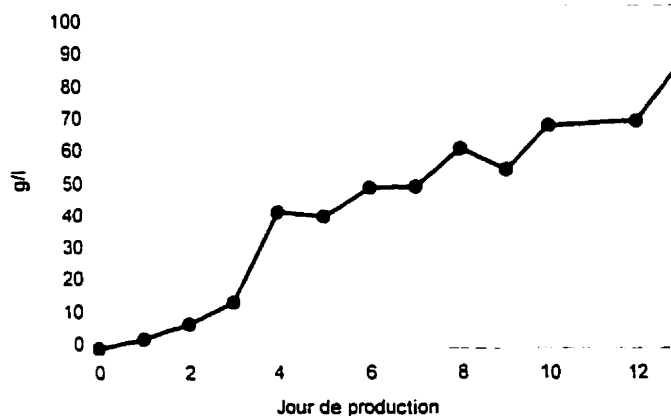


Figure 3. Production de sophorolipides en erlenmeyers de 1000 ml à chicanes (quantification gravimétrique, protocole #P3C)

#### RECOMMANDATIONS

##### • Conservation des échantillons :

Comme il s'agit de solutions biologiques, l'entreposage risque de changer les caractéristiques du milieu. Toutefois, après deux mois d'entreposage de la solution brute à 4°C, les solutions de biosurfactants ont conservé des quantités similaires de biosurfactants, de biomasse, d'huile résiduelle et de glucose. L'identification des biosurfactants par chromatographie en couche mince

(PE#P3F) ne permet pas de détecter de changement de nature des biosurfactants après deux mois d'entreposage.

#### LIMITES DE LA MÉTHODE

- La tension de surface, une méthode commune pour évaluer la concentration de biosurfactants dans le milieu, ne peut être mesurée avec la méthode du Nouy (PE#P3G), en raison de l'huile présente dans le bouillon de production qui cause des interférences. Il faut donc passer par une purification des surfactants et une solubilisation pour évaluer la tension de surface.
- *Mise à l'échelle*

La production de 1600 ml de milieu dans des erlenmeyers de 6 000 ml à chicanes sous les mêmes conditions donnent des rendements en biosurfactants moindres (plus de 25%) tel que montré à la figure 4. Des productions peuvent être réalisées en erlenmeyers d'un litre sans chicanes, en gardant un facteur de remplissage maximal de 20% et une vitesse d'agitation d'au moins 200 rpm. La production en erlenmeyers de 6000 ml sans chicanes sous les mêmes conditions ne permet pas de produire des quantités significatives de surfactants (voir figure 5) et ceci pourrait être dû à une limitation en oxygène (Desphande et Daniels, 1995).

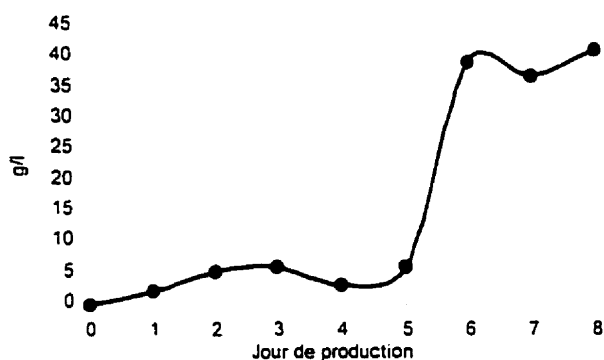
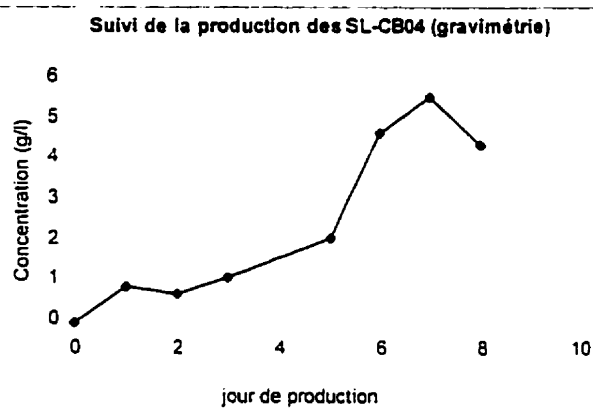


Figure 4. Production de sophorolipides en erlenmeyer de 6 000 ml avec chicanes



**Figure 5.** Production de sophorolipides en erlenmeyers de 6000 ml (sans chicanes) contenant 2000 ml de milieu

## 6. ANNEXES: MODIFICATIONS



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3C	Pages:
Version: 1	Date Début 01-97
	Date fin 10-97

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel

Approuvé par:

Signatures:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Titre:** Méthode d'extraction des sophorolipides (biosurfactants), de la biomasse et de l'huile résiduelle du milieu de production.

**Mots clés:** gravimétrie, *Candida bombicola*, glucose, acétate d'éthyle.

## 1. OBJECTIF(S)

L'objectif de l'expérience est de récupérer la biomasse, les biosurfactants, l'huile végétale résiduelle et la phase aqueuse du milieu de production des sophorolipides par *Candida bombicola* ATCC 22214 (PE#P3B). La séparation des phases est réalisée avec de l'acétate d'éthyle. La biomasse, les sophorolipides et l'huile végétale sont quantifiés par gravimétrie. La quantification du glucose résiduel est réalisée par spectrophotométrie sur la phase aqueuse (protocole P3D).

## 2. MATERIELS

- tubes à centrifuger de 50 ml (nalgene);
- pipettes en verre;
- centrifugeuse;
- acétate d'éthyle (environs 100 ml par échantillon);
- hexane (environs 30 ml par échantillon);
- pipettes pasteur;
- cupules en aluminium pour poids sec de la biomasse;
- fioles jaugées de 25 ml et 100 ml;
- tubes en verres de 15 ml (deux par échantillon)
- fioles à scintillations (une par échantillon);
- ballon de 500 ml s'adaptant au rotavap (*Büchi*);
- rotavap (appareil pour faire évaporer le solvant) installé sous la hotte;

### 3. METHODOLOGIE

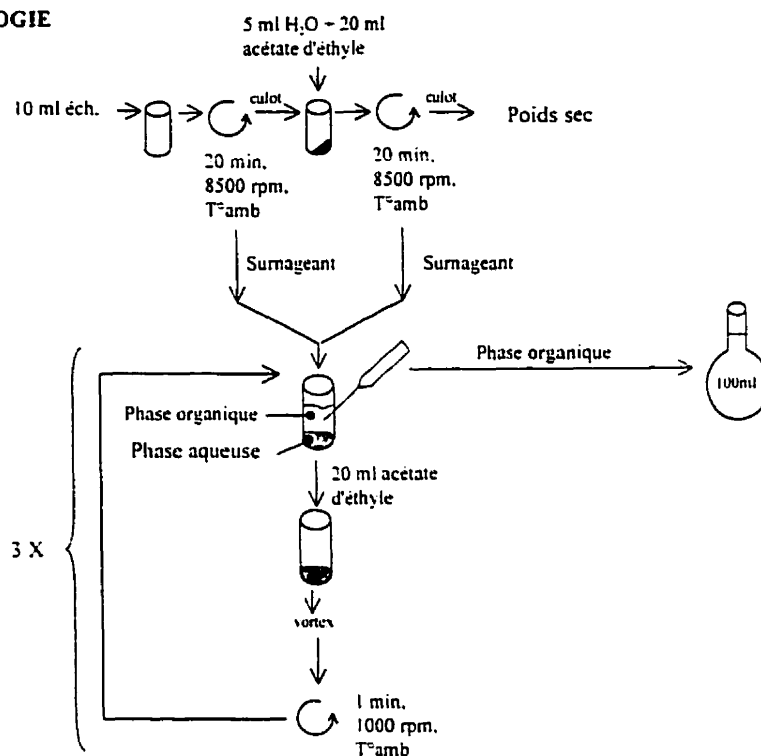


Figure 1. Schéma des étapes 2 à 12 de la méthodologie

1. Ajuster le bain du Rotavap entre 70°C et 80°C;
2. À l'aide d'une pipette, prendre un échantillon de 10 ml, le plus homogène possible (i.e. maintenir une certaine agitation lors de l'échantillonnage) et les mettre dans un tube à centrifuger de 50 ml (tube #1);
3. Prendre le pH et la température, si désiré et centrifuger à 20°C, 8500 rpm durant 20 minutes. Ne pas oublier d'équilibrer les échantillons dans la centrifugeuse;
4. Transférer le surnageant (il y a normalement deux phases) dans un autre tube à centrifuger (tube #2) et mettez-le de côté. Prendre le tube #1 et y ajouter 5 ml d'eau distillée et 20 ml d'acétate d'éthyle (travaillez sous la hotte à partir de ce moment);
5. Resuspendre le culot avec le vortex et remettre le tube #1 à centrifuger sous les mêmes conditions qu'à l'étape 2, pour 20 minutes;
6. Après la centrifugation, sortir le tube #1 de la centrifugeuse et transférer le surnageant (2 phases) dans le tube #2;
7. Avec une pipette pasteur, ajouter un peu d'eau distillée dans le tube #1 pour pouvoir sortir le culot et le



transférer dans une cupule d'aluminium préalablement pesée. Mettre la cupule dans un four à 105°C jusqu'à l'atteinte d'un poids constant (24 heures suffisent habituellement). Calculer le poids sec (g biomasse produite/ l de bouillon de production) selon la formule suivante :

$$\frac{(M_{\text{pleine}} - M_{\text{vide}})_{\text{cupule}} (g) \times 1000 (ml/l)}{10 (ml)}$$

8. Agiter le tube #2 et le mettre à centrifuger à 1000 rpm durant une minute. Cette étape aide à séparer les deux phases;
9. Sortir le tube de la centrifugeuse avec précautions. À l'aide d'une pipette pasteur, retirer la plus grande partie de la phase organique et la transférer dans une fiole jaugée de 100 ml;
10. Ajouter 20 ml d'acétate d'éthyle au tube #2 contenant la phase aqueuse mélanger les deux phases au vortex durant 15 secondes, par pulsions;
11. Centrifuger le tube à 1000 rpm durant une minute;
12. Répéter les étapes 8, 9 et 10 deux autres fois (3 extractions au total);
13. Prendre la fiole jaugée de 100 ml contenant les phases organiques d'extraction et compléter le volume avec de l'acétate d'éthyle. Bien agiter avec un bouchon en verre (pas de paraffine). Prélever 10 ml avec une pipette jaugée et les mettre dans un tube en verre de 15 ml (échantillon pour entreposer à 4°C pour protocole P3E, quantification des sophorolipides en phase organique).
14. Mettre le reste du contenu de la fiole jaugée dans le ballon s'ajustant sur le bec du rotavap. Le fixer à l'appareil. Partir l'eau de refroidissement et ajuster le vide à 240 mbars (vérifier dans le manuel d'instruction). Ajuster la vitesse de rotation du ballon et évaporer le solvant grossièrement (i.e. ne pas faire sécher le résidu);
15. Ajouter le contenu d'une pipette pasteur d'acétate d'éthyle dans le ballon contenant le résidu collant. Pipetter le résidu et le transférer dans un tube à centrifuger (tube #3) préalablement déshumidifié et pesé. Rincer le ballon avec le minimum d'acétate d'éthyle (pipette pasteur) qui est aussi mis dans le tube #3.
16. Placer un bouchon en caoutchouc (comportant une ouverture de même taille que le bec du Rotavap) sur le bec du Rotavap (voir figure2). Il faut que ce bouchon soit serré sur le bec. Percer un trou dans un bouchon bleu des tubes à centrifuger, qui permettra de l'insérer sur le bec du Rotavap. Fermer le tube #3 avec ce bouchon et placez-le sur le rotavap, de façon à ce qu'il soit accoté au bouchon de caoutchouc. Scellez généreusement le tout avec du papier paraffine et débiter l'évaporation sous les mêmes conditions que précédemment. Il faut que tout le solvant soit évaporé avant de retirer le tube (vérifier dans le ballon de récupération de solvant s'il y a encore condensation. Laisser évaporer au moins 10 minutes;

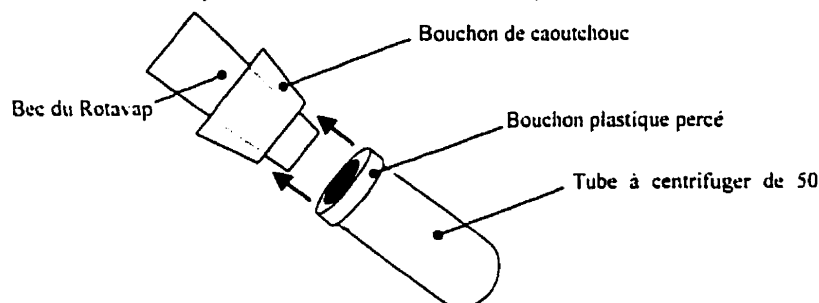


Figure 2. Modifications pour l'évaporation du solvant

17. Une fois l'évaporation terminée, retirer le tube et laisser refroidir le résidu (d'odeur sucrée, de texture mielleuse). Ajouter 20 ml d'hexane au tube #3 et bien agiter au vortex. Le résidu prendra alors l'apparence de flocons beige. Laisser reposer une nuit le tube fermé, après quoi centrifuger à 10 000 rpm durant 20 minutes. Verser avec soin la phase liquide (hexane + huile résiduelle) dans une fiole à scintillation préalablement pesée. Rincer deux fois encore à l'hexane les résidus (maintenant sous forme poudreuse, de couleur crèmeuse) et mettre le liquide dans la fiole, en prenant soin de ne pas entraîner les résidus. Laisser la fiole ouverte sous la hotte pour 2 nuits (où jusqu'à poids constant) et peser. Laisser également le tube à centrifuger #3 qui contient les résidus blanchâtre à sécher sous la hotte jusqu'à l'atteinte d'un poids constant. Peser.

18. La concentration (g/l) d'huile végétale présente dans le milieu de production correspond à :

$$\frac{(M_{pleine} - M_{vide})_{fiole \text{ à scintillation}} (g) \times 1000 (ml/l)}{9 (ml)}$$

19. La concentration (g/l) de biosurfactants produits dans le milieu de production est de :

$$\frac{(M_{pleine} - M_{vide})_{tube \#3} (g) \times 1000 (ml/l)}{9 (ml)}$$

20. Les biosurfactants récupérés peuvent être passés au mortier, ce qui permet d'obtenir une poudre.

#### 4. REFERENCES

- COOPER, D. G., et PADDOCK, D.A. (1984). "Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*." Applied and Environmental Microbiology 47(1): 173-176.
- ZHOU, Q. H., et KOSARIC, N. (1995). "Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*." JAOC 72(1): 67-71.
- DAVILA, A.-M., MARCHAL, R. et VANDECASTEELE, J.-P. (1994). "Sophorose Lipid Production from Lipidic Precursors : Predictive Evaluation of Industrial Substrates." Journal of Industrial Microbiology 13: 249-257.

#### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

La figure 3 présente les mesures obtenues pour le suivi de la biomasse, de l'huile et des sophorolipides lors d'une production en réacteur de 80 litres, à partir de mélasse non raffinée et d'huile végétale usée. Les quatre premiers points de chaque courbe représentent la moyenne de 3 échantillons différents pris au même moment et extraits séparément (données au tableau 1). Les barres d'erreurs reflètent l'erreur expérimentale associée à la méthode d'extraction.

En général, l'erreur est toujours inférieure à 10 % (voir tableau 1). Les erreurs les plus significatives sont observées aux premiers jours de production, là où les quantités récupérées sont faibles en biomasse et en sophorolipides. En fin de production, les erreurs sont faibles et permettent d'obtenir des résultats reproductibles (données non présentées). La variabilité des résultats pour la récupération de l'huile végétale est cependant plus élevée, surtout en début de production. Comme les biosurfactants sont à ce moment en très faible quantité, l'huile n'est pas encore émulsifiée, ce qui rend un échantillonnage difficile. Il se peut cependant que l'échantillonnage soit aussi difficile en fin de production, en raison de la forte concentration en

sophorolipides qui rend la solution dense et change sa rhéologie (Davila *et al.*, 1992).

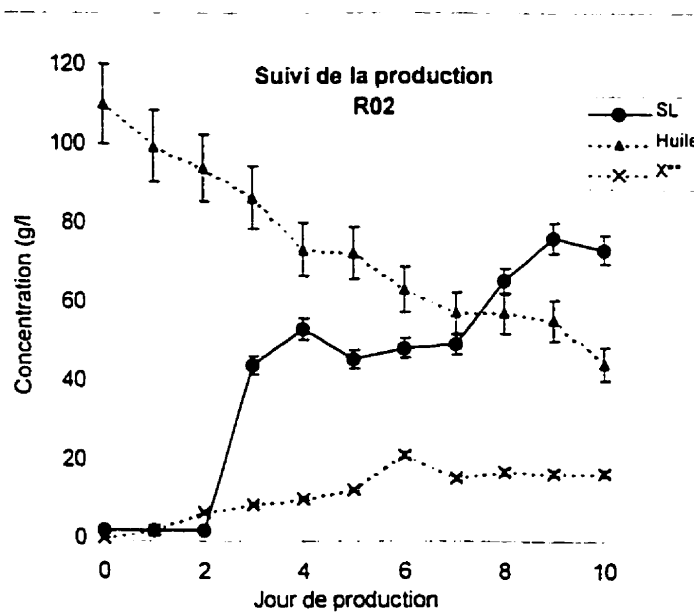


Figure 3.

Tableau I.

Analyse d'erreur sur les extractions - gravimétrie  
(sophorolipides (SL), huile, biomasse (X))

## 1- Sophorolipides

	Concentration (g/l)					
Jour	a	b	c	Moyenne	Écart-type	Erreur (%)
0	2,8	2,8	2,7	3	0,0	1,7
1	2,8	2,6	2,5	3	0,1	4,7
2	2,5	2,8	2,8	3	0,1	5,2
3	42	46	47	45	2,2	4,8

## 2- Huile végétale

	Concentration (g/l)					
Jour	a	b	c	Moyenne	Écart-type	Erreur (%)
0	105	124	103	111	9,5	8,6
1	111	91	98,3	100	8,3	8,3
2	96	95	93	95	1,2	1,3
3	87	87	87	87	0,0	0,0

3-  
Biomasse

	Concentration (g/l)					
Jour	a	b	c	Moyenne	Écart-type	Erreur (%)
0	2,5	2	1,7	2	0,3	16,0
1	4	4,3	3,9	4	0,2	4,2
2	9,2	8,5	8,3	9	0,4	4,5
3	11,2	10,9	10,4	11	0,3	3,0

## 6. ANNEXES: MODIFICATIONS

Le protocole tel que décrit fut modifié par rapport à ceux publiés dans la littérature où les extractions sont réalisées à l'aide d'ampoules à décanter. Cette méthode ne permet pas d'obtenir un résidu propre (ne comportant pas d'impuretés visibles). De plus, la séparation des phases lors des extractions était très lente et donnait souvent lieu à une troisième phase à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse. C'est pourquoi il fut décidé de briser l'émulsion (la "troisième" phase) par centrifugation modérée. L'application de cette méthode donna de très bons résultats et diminua significativement le temps consacré aux extractions, tout en minimisant la vaisselle employée et le transfert des échantillons d'un récipient à l'autre (minimise l'erreur).

Les sophorolipides étaient initialement quantifiés directement dans le ballon à évaporation de 500 ml allant au Rotavap. Par cette méthode, il était cependant difficile de les récupérer car ils étaient séchés et collés sur la paroi au fond du ballon. De plus, la masse des sophorolipides récupérés était minime par rapport à la masse du ballon sec, ce qui risquait d'entraîner des erreurs significatives. Pour ces raisons, il fut décidé de faire évaporer le solvant directement dans des tubes à centrifuger, moyennant quelque bricolage du Rotavap (figure 2).

Protocole: FORMTEXTEPE3D . Version: 1 . Page: 1, c:/windows/pe.doc, 96-06-07



### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

**Protocole #:** PE3D

**Version:** 1

**Pages:**

**Date:** 21-04-97

**Signatures:**

**Auteurs:** Muriel Gueissaz-Teufel

**Approuvé par:**

**Date:**

**Titre:**

Analyse des sucres en phase aqueuse par méthode colorimétrique au phénol

**Mots clés:**

Glucose, phénol.

#### 1.00 Objectif(s)

L'objectif de l'expérience est de déterminer quantitativement la concentration en glucose dans un milieu aqueux.

#### 2.00 Matériels et Méthodes

- Matériel :**
- Fioles jaugées de 1, 10, 25, 50 et 100 ml ;
  - Micropipettes (20µl, 100µl et 5ml) ;
  - Seringues Hamilton gastight RN (1ml, 5ml) ;
  - Éprouvettes en verre de 10 ml ;
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré 95.5% (SG 1.84) ;
  - Phénol ;
  - Cuvettes Hach pour analyse colorimétrique (visible) ;
  - Spectrophotomètre ;

**Méthode :***Solutions standards*

1. Préparer une solution stock de 1 g/L de glucose.
2. À partir de la solution stock, préparer des solutions standards de glucose qui serviront au tracé de la courbe de calibration. Les concentrations doivent être comprises dans la plage de 10 µg/ml à 100 µg/l :

exemple : 100 µg/ml  $\Rightarrow$  5 ml @ 1000 µg/ml dans une fiole jaugée de 50 ml ;  
 75 µg/ml  $\Rightarrow$  3.75 ml @ 1000 µg/ml dans une fiole jaugée de 50 ml ;  
 50 µg/ml  $\Rightarrow$  2.5 ml @ 1000 µg/ml dans une fiole jaugée de 50 ml ;  
 25 µg/ml  $\Rightarrow$  1.25 ml @ 1000 µg/ml dans une fiole jaugée de 50 ml ;  
 (Note : prendre les seringues de 1 ml ).

*Réactifs*

1. Acide sulfurique concentré à 95.5%, SG = 1.84;
2. Solution de phénol concentrée à 80%(p/p):  
 Ajouter 20 grammes d'eau distillée à 80 grammes de phénol.

*Préparation des échantillons*

1. 2 ml d'une solution aqueuse contenant entre 10 et 70 µg/ml de sucres (faire les dilutions nécessaires) est pipetée dans une éprouvette en verre Hach de 10 ml;
2. Ajouter, à l'aide d'une micropipette, 50 µl de solution de phénol à 80%;
3. À l'aide d'une micropipette de 5 ml (dont le bout du distributeur est coupé pour faciliter l'écoulement), ajouter rapidement 5 ml d'acide sulfurique (sous la hotte). Diriger le jet sur la surface du liquide plutôt que sur la paroi de l'éprouvette, pour assurer un bon mélange;
4. Laisser reposer les tubes durant 10 minutes. En profiter pour allumer le spectrophotomètre, qui a besoin d'être "réchauffé" avant les analyses, ainsi que le bain thermostaté à 25°C-30°C (on pourra utiliser le bain du *rotavap*);
5. Agiter les tubes et les placer dans le bain durant 10 à 20 minutes;
6. Bien essuyer la surface des éprouvettes avant la lecture au spectrophotomètre;
7. Mesurer l'absorbance à 490 nm.

*Spectrophotomètre:*

Suivre la démarche indiquée dans le manuel d'instruction (au laboratoire GC), pour lecture dans le domaine visible.

**3.00 Conservation des échantillons**

Solutions stocks de glucose: ces solutions, conservées à 4°C à l'obscurité, sont stables pour plusieurs mois.

Solution de phénol (80%): Cette solution, conservée à 4°C à l'obscurité, est stable pour plusieurs mois (une coloration jaune pourra apparaître, mais celle-ci n'interférera pas avec les analyses; toutefois, s'assurer de faire un blanc);

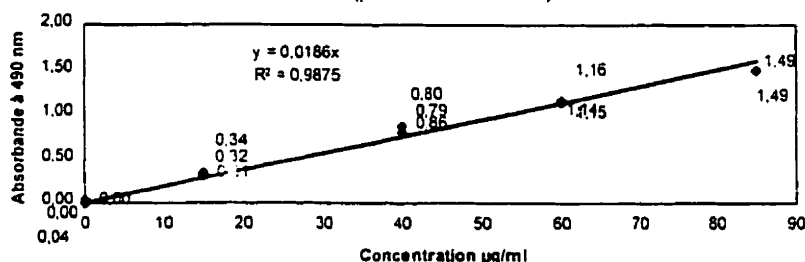
La couleur (après étape 5) pour mesure de l'absorbance est stable pour plusieurs heures: les lectures peuvent être effectuées plus tard si nécessaire.

#### 4.00 Résultats

Voici les lectures obtenues pour une courbe de calibration du glucose:

Concentration µg/ml	Absorbance			Moyenne	Écart type
0	0.00	0.00	0.04	0.01	0.02
15	0.31	0.32	0.34	0.32	0.02
40	0.86	0.79	0.80	0.82	0.02
60	1.14	1.15	1.16	1.15	0.02
85	1.49	-	1.49	1.49	0.02

Courbe de calibration du glucose  
30-10-97 (p.35 cahier labo#65)



#### 5.00 Recommandations

##### Précision des lectures

Il est recommandé de ne conserver que 2 chiffres après la virgule sur les lectures du spectrophotomètre.

##### Dilutions

Tenir compte des proportions lors des dilutions. Par exemple, il est fortement suggéré de faire 2 dilutions successives (1 ml dans 10 ml, puis 1 ml dans 100 ml pour une dilution finale de 1000X) qu'en une seule étape (1 ml dans 1000 ml). Pour des volumes à mesurer inférieurs à 100 µl, l'usage d'une seringue plutôt que d'une micropipette est suggéré. L'important est de garder la même procédure pour toutes les analyses d'une même expérience.

##### Influence du milieu d'analyse vs le milieu de calibration

Les éléments présents dans le milieu analysés pourraient influencer la mesure de concentration en glucose. Dans le cas de l'analyse de phases aqueuses extraites à l'acétate d'éthyle (PE#P3C), une analyse de variance a été effectuée pour évaluer l'influence du solvant résiduel (solubilité ≈ 10%). Les mesures



ont été réalisées pour une concentration de 50 µg/ml en glucose (le milieu de la courbe de calibration), à différents pourcentages en acétate d'éthyle (0%, 1%, 5% et 10%). 10% étant la concentration maximale possible de solvant dans la phase aqueuse en raison de la solubilité. Pour chaque concentration, six éprouvettes différentes furent analysées. Les lectures d'absorbance à 490 nm furent les suivantes en fonction de la concentration en solvant (r.f. cahier de labo 28, pages 93-95):

0% solvant	1% solvant	5% solvant	10% solvant
0.85	0.86	0.78	0.84
0.89	0.81	0.87	0.86
0.93	0.84	0.94	0.81
0.84	0.88	0.88	0.82
0.84	0.86	0.90	0.01
0.85	0.84	0.86	0.94

L'analyse de variance sur ces données ne permet pas de mettre en évidence toute influence de l'acétate d'éthyle sur les mesure de glucose dans le milieu. Cependant, pour assurer les analyses, il est tout de même suggéré de préparer des solutions de calibration à 5% d'acétate d'éthyle, de même que les solutions nécessaires aux dilutions.

#### *Contrôle de la qualité*

Les mesures suivantes permettent de vérifier la qualité des analyses:

- Une **courbe de calibration** doit être tracée à chaque fois que l'on utilise le spectrophotomètre.
- Un **blanc** (où l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée) doit toujours être fait en début de mesures (il pourra également être repassé entre deux échantillons);
- Il est fortement recommandé de faire des triplicata. Si les résultats sont satisfaisants (i.e. peu de variation dans les mesures), effectuer au moins un **duplicata à toutes les 10 ou 20 mesures**
- Un **contrôle** où la concentration en glucose est connue (mais qui ne provient pas des solutions stocks), de préférence un milieu contenant les mêmes éléments que celui analysé (i.e. pas seulement de l'eau distillée et du glucose);
- Un **ajout dosé**, où on ajoute une quantité connue de glucose à un échantillon qui est également analysé: On pourra alors comparer les deux mesures et déterminer si on mesure bien la quantité ajoutée;

#### **6.00 Limites de la méthode**

S'il y a trop de matières en suspension dans le milieu les lectures seront totalement instables. Il faut alors filtrer les échantillons.

#### **7.00 Références**

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, Rebers, P.A., and Smith, F., Coloric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, Volume 28, n°3, March 1956. pp350-356.



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3E	Pages:
Version: 1	Date Début: 22-04-97
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Titre:** Quantification des sophorolipides (biosurfactants) par méthode indirecte: analyse du glucose dans la phase organique  
**Mots clés:** Biosurfactants, *Candida bombicola* ATCC 22214, phase organique, acétate d'éthyle, méthode colorimétrique, phénol, hydrolyse..

## 1. OBJECTIF(S)

Les sophorolipides sont des biosurfactants produits par *Candida bombicola* ATCC 22214 (PE#P3B). Parmi les méthodes de quantification des biosurfactants se trouve la méthode gravimétrique, après extraction du bouillon de production et lavage à l'hexane de la phase organique préalablement évaporée (PE#P3C).

Il est cependant possible d'évaluer la concentration en sophorolipides dans la phase organique, évitant les étapes d'évaporation et de lavage à l'hexane. En effet, dans cette phase sont concentrés les sophorolipides, l'huile végétale résiduelle du milieu de production et l'acétate d'éthyle ayant servi d'agent d'extraction.

*L'objectif de l'expérience est de déterminer quantitativement, par le biais de l'hydrolyse des molécules de sophorolipides et d'informations structurales, la concentration en biosurfactants de type sophorolipides après une extraction à l'acétate d'éthyle.*

## 2. THEORIE

L'extrémité hydrophile des sophorolipides est un sophorose. Le sophorose est un disaccharide, formé de deux monosaccharides liés l'un à l'autre par une liaison glucosidique entre le carbone anomère de l'un et l'hydroxyle de l'autre (**figure 1**). L'hydrolyse des sophorolipides par un acide fort devrait donner, en rompant les lien glucosides, deux unités de glucose (glucopyrannose) par molécule de sophorolipide. En se basant sur l'analyse structurale des sophorolipides réalisée par Asmer et ses collaborateurs (1988), on peut estimer une valeur moyenne de masse moléculaire pour le mélange de sophorolipides produit durant la fermentation. Une valeur moyenne de 1.91 g de sophorolipides par gramme de glucose fut utilisée par Desphande et Daniels (1995).

Après extraction à l'acétate d'éthyle du bouillon de production, une analyse du glucose par spectrophotométrie dans la phase organique permet de quantifier les sophorolipides : l'hypothèse est faite que le glucose présent dans cette phase est essentiellement associé aux biosurfactants, puisque le glucose (hydrophile) présent dans le bouillon de production (non consommé) demeure dans la phase aqueuse. De plus, comme la production de sophorolipides se chiffre en g/l dès les premiers jours de production, la dilution des échantillons sera suffisamment grande pour que l'analyse soit toujours réalisée sur des échantillons aqueux (avec au plus 10% de phase organique solubilisée). Cette démarche fut suivie par Desphande et Daniels (1995) pour la quantification des sophorolipides, qui n'ont toutefois pas précisé les limites de la méthode, ni sa précision. Leur quantification était réalisée par l'essai à l'anthrone, mais cette méthode est de précision limitée pour des sucres méthylés et des pentoses (Dubois *et al.*, 1956). La méthode au phénol est efficace pour les polysaccharides (Dubois *et al.*, 1956).

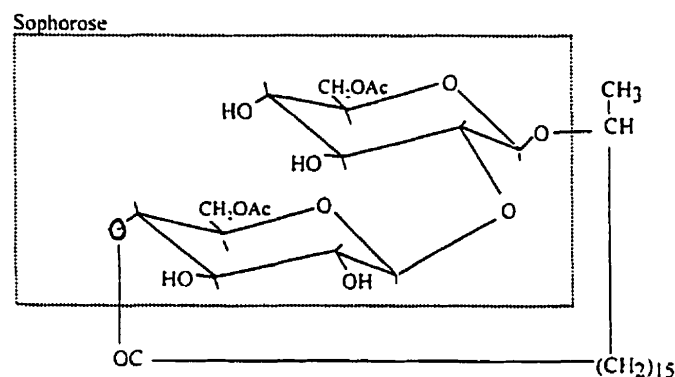


Figure 1 : Structure d'un biosurfactants sophorolipide SL-I (tiré de Asmer *et al.*, 1988). Ac= groupe acétyle. Formule chimique =  $C_{34}H_{58}O_{14}$

### 3. MATERIELS ET METHODOLOGIE

Voir le protocole expérimental #P3D. Faire la courbe standard avec des solutions à 5% d'acétate d'éthyle. Le standard utilisé est le glucose (Desphande et Daniels, 1995). Diluer les échantillons avec de l'eau distillée.

### 4. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Le tableau 1 illustre les résultats obtenus pour différents échantillons (r.f. cahier labo 65, page 69). L'erreur moyenne sur les mesures (triplica) est de 4%.

Ces mêmes résultats sont illustrés sous forme graphique, en comparant les données obtenues par gravimétrie (figure2).

**Tableau 1:** Concentration en sophorolipides estimée par spectrophotométrie (1,91g SL/g glucose: coube standard:  $y = 0,0195x$ ).

Échantillon	Dilution*	Absorbance			Moy.	Écart-type	Conc.SL (g/l)	Conc.SL(g/l) Gravimétrie
		a	b	c				
CB06#1p1	10	0,72	0,76	0,64	0,68	0,06	1	3
CB06#1p3	250	0,65	0,62	0,60	0,63	0,04	15	14
CB06#1p4	250	1,33	1,26	1,39	1,36	0,04	33	42
CB06#1p8	500	0,49	0,50	0,45	0,48	0,03	24	62
CB06#1p12	500	0,72	0,73	0,72	0,72	0,00	35	70
RO2p0-a	10	0,80	0,76	0,65	0,74	0,03	1	3
RO2p4	250	0,71	0,68	0,69	0,69	0,01	17	54
RO2p6	500	0,63	0,56	0,57	0,59	0,04	29	49
RO2p8	1000	0,38	0,36	0,33	0,36	0,04	35	66
RO2p9	500	0,92	0,89	0,91	0,91	0,01	44	77

\* :ml solution analysée/ml bouillon

ex: 25ml analysés/1ml extrait x 100ml extraits/10ml échantillonnés

Notes:CB06 = milieu de production à base d'huile végétale vierge et glucose, non stérilisé, en erlenmeyer de 1000 ml.

RO2 = milieu de production à base d'huile végétale usée et de mélasse non raffinée, non stérilisé, en réacteur de 80 litres.

SL = sophorolipides

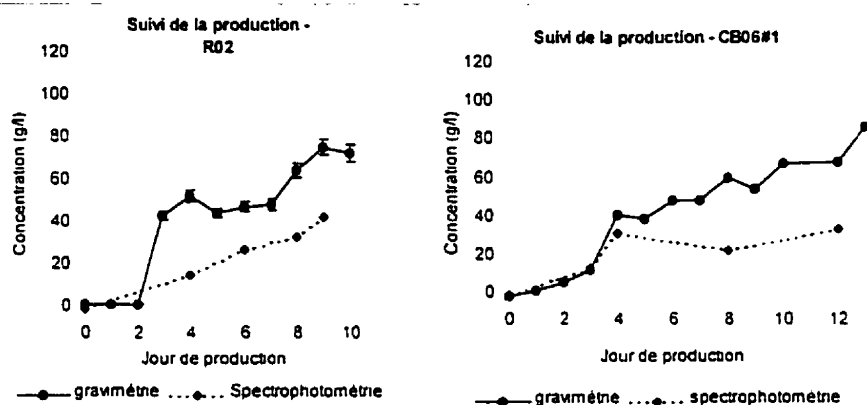


Figure 2. Comparaison des méthodes de quantification des sophorolipides.

En comparant avec les données obtenues par gravimétrie, on observe de grands écarts entre les mesures, particulièrement à partir de la moitié de la production (jour 4 et +). Les mesures par spectrophotométrie suivent toutefois la tendance des mesures gravimétriques. Les explications peuvent être nombreuses, étant donné la complexité du mélange de sophorolipides produits (formes acétylées ou non), la différence entre les substrats alimentés dans les deux productions et leur influence sur la structure des sophorolipides. Selon Asmer *et al.* (1988), les formes non acétylées de sophorolipides (SL-6) sont formées en premier par les micro-organismes pour ensuite évoluer vers la forme SL-1 (acétylée). Cette dernière, dans les conditions de production présentées, peut former de 50% à 75% de la masse totale produite (Zhou et Kosaric, 1995). Il est dans ce cas probable que la rupture des liens glucosidique et l'hydrolyse des molécules n'aient pas été complètes lors de la réaction avec les formes acétylées.

La méthode de quantification au phénol devrait être mise au point de façon systématique. La méthode de quantification à l'anthrone devrait également être évaluée pour voir si elle s'applique mieux. Pour l'instant, la méthode colorimétrique au phénol de quantification des sophorolipides en phase organique ne devrait pas être employée seule : elle permet tout au plus de voir l'ordre de grandeur de la production.

## 5. RÉFÉRENCES

- ASMER, H.-J., LANG, S., WAGNER, F., et WRAY, V. (1988). "Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids." *JAOCS* 65(9): 1460-1466.
- DESPHANDE, M., et DANIELS, Lacy (1995). "Evaluation of Sophorolipids Biosurfactant Production by *Candida Bombicola* Using Animal Fat." *Bioresource Technology* 54: 143-150.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, REBERS, P.A., AND SMITH, F. 1956. "Coloric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- ZHOU, Q. H., et KOSARIC, N. (1995). "Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*." *JAOCS* 72(1): 67-71.



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3F	Pages:
Version: 1	Date Début: 03/07/97
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Titre:** Identification des sophorolipides par chromatographie en couche mince (CCM) (*Thin Layer Chromatography*)

**Mots clés:** Biosurfactants, lipides, *Candida bombicola* ATCC 22214, séparation, gel de silice.

## 1. OBJECTIF(S)

L'objectif principal de l'expérience analytique est de *confirmer la présence* de sophorolipides dans le milieu de cultivation de *Candida bombicola* ATCC 22214 (PE#P3B) extrait à l'acétate d'éthyle (PE#P3C). L'identification exhaustive des sophorolipides n'est pas visée, ni leur quantification ait à l'acétate d'éthyle.

## 2. MATERIELS

### REACTIFS:

#### 1. Solvant

- Chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), grade HPLC, *Fisher*
- Méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), grade HPLC, *Anachemia*
- Eau Accusolv, grade HPLC, *Anachemia*

Faire la solution de solvant suivante<sup>1,2,3</sup>:

65/15/2 ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ )(v/v/v)

- <sup>1</sup> Le volume nécessaire pour chaque développement dépend du volume de la chambre et de la hauteur de solvant désirée. Pour la chambre *Supelco* disponible au laboratoire (voir sous « matériel ») et pour une hauteur de solvant de un cm il faut disposer d'environ 150 ml de solvant pour chaque développement.
- <sup>2</sup> Il est important de toujours faire la même procédure pour que les solutions soient toujours identiques. Préférentiellement, faire la solution de solvant juste avant son utilisation, puisque le chloroforme très volatil a tendance à s'évaporer au-dessus du mélange de solvants et change les proportions..

<sup>3</sup> À cause des enthalpies de mélange, toujours mesurer les mélanges séparément puis les mélanger ensembles ; le volume total ne sera pas nécessairement la somme des volumes avant mélange, d'où l'importance de suivre la même procédure à chaque fois.

## 2. Réactifs à détection A1 et A2

- $\alpha$ -Naphthol
- Méthanol
- Acide sulfurique

A1 :- Préparer une solution de 0,5%  $\alpha$ -naphthol dans 100 ml de méthanol-acide sulfurique (1:1):

50 ml acide sulfurique + 50 ml méthanol + 0.5 ml  $\alpha$ -naphthol

A2 :- Solution d'acide sulfurique concentré (95%):

## 3. Réactif à détection B

- D-Anisaldéhyde (98%, *Aldrich Chemicals*)
  - Acide sulfurique concentré (95-98%, *Anachemia*)
  - Acide acétique glacial (99,7%, *Anachemia*)
- Faire la solution en commençant avec l'acide acétique dans un bain de glace;
- Ajouter doucement l'acide sulfurique concentré ;
- Ajouter l'anisaldéhyde.
- Une fois que la solution est froide, la retirer du bain.

## 4. Standards internes

- Cholestérol (5-Cholesten-3 $\beta$ -ol) (99+%, *Sigma*) : 1 mg/10 ml d'acétate d'éthyle ;
- Cholestéryl acétate (3 $\beta$ -Acetoxy-5-cholestene ; 5-Cholesten-3 $\beta$ -ol) (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>) (*Sigma*) : 1mg/10ml d'acétate d'éthyle.

## MATERIEL:

- Micropipettes capillaires (1  $\mu$ l) (*Drummond*)
- Plaques à CCM 20 cm x 20 cm x 1mm Kiesegel 60F<sub>254</sub> (*Merck*, Darmstadt, Allemagne)
- Chambre à développement *Aldrich* 27,5 cm x 27,5 cm x 7,5 cm (avec crête)
- Pulvérisateur à CCM *Supelco*
- Règle
- Crayon à mine de plomb grasse

### 3. METHODOLOGIE

TOUTES LES MANIPULATIONS DOIVENT SE FAIRE SOUS LA HOTTE, AVEC GANTS (2 PAIRES MIN), SARREAU ET LUNETTES ⇒ LES REACTIFS NE SONT PAS L'USER FRIENDLY....

#### 1. Développement

- Mettre 1 cm de hauteur de solvant dans la chambre à développement (150 ml, cylindre gradué de 250 ml) et fermer la chambre avec la plaque en verre pour saturer l'atmosphère de la chambre en solvant ;
- Découper la plaque si nécessaire ;
- Avec un crayon à mine, faire les lignes suivantes sur la plaque à CCM (à partir de la base): 2 cm, 14 cm ;
- Avec un crayon à mine, faire des points sur la ligne de 2 cm, à 2 cm de distance chacun (voir figure 1) ;
- Avec une micropipette, prendre un échantillon de 1  $\mu$ l du standard interne. Appliquer par petits coups
- au niveau de la marque de 2 cm (sur un point) en touchant légèrement la plaque avec le bout de la micropipette. Laisser le contenu se vider par capillarité, sans presser. On peut souffler légèrement sur la plaque au moment de l'application pour limiter la diffusion du *spot*. Plus le spot est petit, mieux sera la séparation. Répéter 5 fois (pour appliquer 5  $\mu$ l). Jeter la micropipette.
- Répéter pour les autres échantillons à analyser en distribuant les spots également sur la plaque ;
- Rapidement, mais avec précautions, entrouvrir la chambre de développement. À l'aide de pinces, y déposer la plaque, légèrement inclinée, LA FACE RECOUVERTE D'ALUMINIUM VERS LE BAS (s'assurer que la ligne de solvant ne touche pas les spots) et refermer immédiatement.
- Suivre attentivement l'avancée du front de solvant sur la plaque. Lorsqu'il atteint la marque de 14 cm (environs une heure) retirer immédiatement la plaque (et marquer l'arrêt réel du front) et la laisser sécher à l'air.

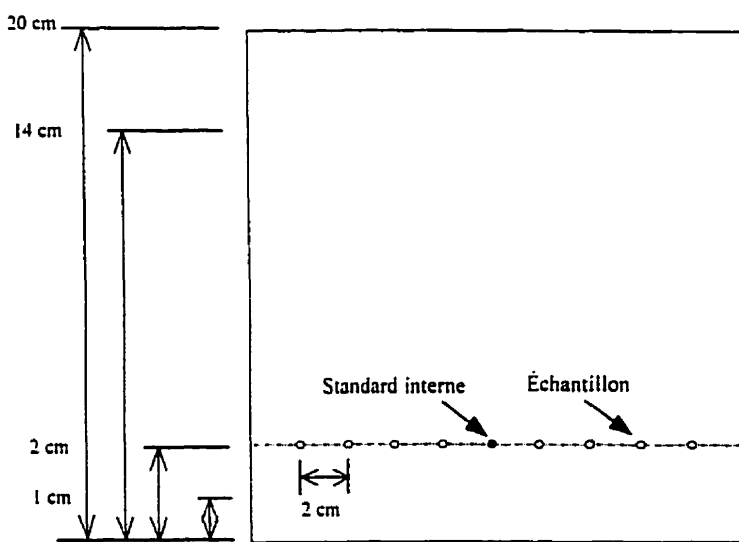


Figure 1: disposition des échantillons sur la plaque (« spots »).



## 2. Visualisation

### REACTIFS A1 ET A2 :

- Avec le vaporisateur, diriger le premier jet de réactif A1 ( $\alpha$ -naphtol) à côté de la plaque. Quand le jet semble uniforme, vaporiser de haut en bas la plaque, jusqu'à ce qu'elle devienne translucide.
- Sécher la plaque à l'air.
- Avec le vaporisateur, vaporiser le réactif A2 ( $H_2SO_4$  concentré) de la même manière que le A1.
- Chauffer la plaque à  $120^\circ C$  dans un four sous une hotte jusqu'à ce que la coloration soit maximale.
- Marquer immédiatement les spots (faire le tour avec un crayon mine)

### REACTIF B :

- Vaporiser le premier jet de réactif B (anisaldéhyde) à côté de la plaque. Quand le jet semble uniforme, vaporiser de haut en bas la plaque, jusqu'à ce qu'elle devienne translucide.
- Chauffer la plaque à  $90^\circ C$  -  $120^\circ C$ , dans un four sous une hotte, en tenant la plaque à CCM avec des pinces, durant 1-15 minutes. Des spots colorés apparaîtront.
- Marquer immédiatement les spots (faire le tour avec un crayon mine), placer la plaque dans une chemise en plastique et faire une photocopie.

Rincer le vaporisateur avec le solvant ( $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ ) après chaque usage.

## 3. Calcul des $R_f$ et $R_x$

Les positions des différentes zones séparées sur la plaque chromatographique sont décrites par les valeurs  $R_f$  et  $R_x$  de chaque substance. Pour chaque spot (soluté) révélé sur la ligne de migration d'un échantillon initialement déposé, on calcule :

par rapport au solvant :

$$(R_f)_i = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté « i »}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

par rapport au standard interne :

$$(R_x)_i = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté « i »}}{\text{Distance parcourue par le standard X}}$$

## NOTES

- L'iode n'est pas suggéré comme réactif à détection parce qu'il ne permet pas d'apparaître les glycolipides distinctement.
- Les  $R_x$  sont plus reproductibles que les  $R_f$ .
- Les plaques à CCM révélées peuvent être photocopiées et conservées avec une pellicule de plastique fine.

Toutefois, si une publication est envisagée, une photo serait nécessaire.

- Les valeurs des  $R_f$  des sophorolipides devraient varier de 0.08 à 0.65 (Asmer *et al.*, Davila *et al.*).
- Tout le matériel doit être rincés trois fois à l'eau distillée (grade HPLC), au méthanol et au chloroforme.
- Le développement de la chambre (avancée du front de solvant) prend environs une heure.

#### 4. REFERENCES

DAVILA, A. M., MARCHAL, R., MONIN, N. AND VANDECASTEELE, J.P. (1993). "Identification and Determination of Individual Sophorolipids in Fermentation Products by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection." Journal of Chromatography **648**(1993): 139-149.

DESPHANDE, M., and DANIELS, Lacy (1995). "Evaluation of Sophorolipids Biosurfactant Production by *Candida Bombicola* Using Animal Fat." Bioresource Technology **54**: 143-150.

FRIED, B. A. S., JOSEPH. Lipids (chapter 21, HAndbook of TLC, 2nd edition). Handbook of Thin-Layer Chromatography: Second Edition, Revised and Expanded. J. S. a. B. Fried, Marcel Dekker Inc.: 683-714.

FRIED, B. A. S., JOSEPH. (1994). Thin-Layer Chromatography: techniques and applications, Marcel Dekker Inc.

PAVIA, D. M., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. (1988). Thin-Layer Chromatography (technique 11). Introduction to Organic Laboratory Techniques: Third Edition. Washington, Saunders College: 615-629.

#### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

- Le réactif à l'anisaldéhyde (réactif B) s'est révélé plus approprié et plus simple d'application que les réactif A1 et A2.
- Le spot du cholestérol n'apparaît pas : il est trop polaire et semble entraîné avec le front de solvant. Le 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, le 11 $\alpha$ -hydroxyprogestérone, de la cortisone et de la galactocérébroside ont par la suite été employés et n'ont pas non plus été de polarités adéquates pour la plaque et le solvant. Aucun autre standard n'a été utilisé par la suite.
- Une photocopie de chromatographie est jointe au document. Les marques laissées permettent de faire l'hypothèse que des sophorolipides ont été produits durant la fermentation (pour être certains de leur identité, il faudrait faire des analyses au HPLC). On remarque le plus gros spot qui identifie normalement les sophorolipides lactones SL-I. Les valeurs de  $R_f$  sont un peu plus élevées que les valeurs publiées dans la littérature (de l'ordre du dixième). Ces écarts peuvent être attribuables aux produits chimiques, aux équipements ou aux manipulations qui diffèrent d'un individu à l'autre. Mais le fait que les spots soient révélés dans cette plage, pour ce mélange de solvant et cette plaque de polarités spécifiques augmente fortement les probabilités que ce soient des sophorolipides. D'autant plus qu'ils sont produits durant la fermentation de la levure productrice (seul le spots de l'huile végétale apparaît au jour 0). Sur la foi de ces analyses, il est conclu qu'il s'agit bien de sophorolipides.



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3G	Pages:
Version: 1	Date Début
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel Approuvé par:	Signatures:
	_____
	_____
	Date: ____ / ____ / ____

**Titre:** Mesure de la tension de surface et détermination de la concentration micellaire critique  
**Mots clés:** tensiométrie, dilutions, méthode du Nouy

### 1. OBJECTIF(S)

L'objectif est de mesurer la tension de surface d'une solution donnée, ainsi que de déterminer la concentration micellaire critique d'un agent tensioactif.

### 2. MATERIELS

- Tensiomètre Fisher Scientific Ltd, modèle 21 Tensiomat semi-automatique;
- Coupes en pyrex de 80mm X 40 mm, #3140;
- Anneau de platine;
- Eau distillée, éthanol;

### 3. METHODOLOGIE

- Calibrer l'appareil en suivant les indications du manuel d'instruction, rangé avec le tensiomètre (mettre un poids de 600mg sur un papier paraffiné posé sur l'anneau de platine, ajuster le cadran pour que la tension soit d'environ 49,4 dynes/cm. Ajuster si nécessaire en allongeant ou raccourcissant le bras du haut de la potence);
- Rincer l'anneau de platine et les coupes en pyrex à l'éthanol, puis à l'eau distillée;
- Mettre 50ml d'eau distillée dans une coupe et la déposer sur le plateau du tensiomètre;
- Mettre en place l'anneau de platine et libérer la potence;
- Lorsque l'anneau est stable, remonter le plateau soutenant la coupe (avec la manivelle à la droite de l'appareil) et amener doucement la coupe de façon à ce que la surface du liquide touche l'anneau de

platine (figure 1). Ajuster l'aiguille du miroir au bout de la potence, de façon à ce que sa réflexion concorde avec le repère tracé sur le miroir.

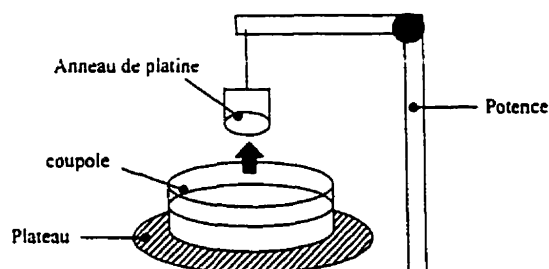


Figure 1. Mesure de la tension de surface

- Mettre l'appareil en marche, en relevant le bouton de mise en marche (en face de l'appareil). L'appareil applique une tension sur l'anneau jusqu'à ce qu'il se détache de la surface du liquide. Lorsque l'anneau se décroche de la surface, prendre la mesure de la tension de surface, au dixième près, sur le cadran en face de l'appareil. Remettre le cadran à zéro ;
- Répéter la mesure, en rinçant l'anneau à l'éthanol et à l'eau distillée, jusqu'à ce qu'au moins trois mesures de tension de surface soient similaires. La mesure théorique de la tension de surface de l'eau distillée devrait être de 72 dynes/cm, néanmoins, les mesures avec l'appareil disponible au laboratoire sont de l'ordre de 76 dynes/cm à 78 dynes/cm ;
- Suivre la même procédure pour 50ml d'une solution de concentration ou de dilution connue en agent tensioactif;
- Tracer la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration ou de la dilution et déterminer la concentration micellaire critique (CMC) (voir figure 2) ou la dilution micellaire critique (CMD);

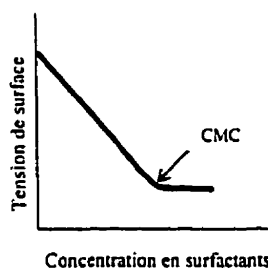


Figure 2. Concentration micellaire critique

#### 4. REFERENCES

THANGAMANI, S., et SHREVE, G.S. (1994). "Effect of Anionic Biosurfactant on Hexadecane Partitioning in Multiphase Systems." Environ. Sci. Technol. **28**(12): 1993-2000.

PARKINSON, M. (1985). "Bio-Surfactants." Biotechnology Advances **3**: 65-83.

#### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

- Il est recommandé d'utiliser de la verrerie jaugée pour faire les dilutions des échantillons :
- L'éthanol peut être remplacé par de l'acétone, mais il faut toujours terminer par un rinçage à l'eau distillée;
- La présence de deux phases ou d'impuretés dans la solution engendre d'importantes interférences, de même que la présence de mousse.

#### 6. ANNEXES: MODIFICATIONS



PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3H	Pages:
Version: 1	Date Début 04-97
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Titre: Vérification de la pureté du milieu de production de *Candida bombicola* ATCC 22214.  
Mots clés:

## 1. OBJECTIF(S)

L'objectif est de vérifier si la production de biosurfactants par la levure *C. bombicola* est possible à partir de rejets industriels et dans un milieu non stérilisé avant inoculation. Il s'agit de vérifier s'il y a eu croissance de microorganismes opportunistes autres que la levure durant la production. La vérification se fait par le biais de décomptes sélectifs sur géloses nutritives en début et en fin de production.

## 2. MATERIELS

- Géloses YM (voir protocole P3A), minimum douze (pour couvrir au moins 4 log);
- Géloses NG, minimum douze (pour couvrir au moins 4 log) :
  - Nutrient Broth Difco .....0,8%
  - Extrait de levure.....0,1%
  - Glucose .....1,0%
  - Agar .....1,2%
- Mini éprouvettes à microbiologie stériles (autoclavées);
- Micropipette et embouts stériles (autoclavés);
- "Tourne-disque" pour étalement sur pétris;
- Pipettes en verre pliées pour étalement;
- Éthanol pour désinfecter;
- Eau saline stérile.

### 3. METHODOLOGIE

*Travailler sous la hotte stérile. Pour vérifier la pureté du milieu, des décomptes sont réalisés sur des géloses favorisant la croissance de levures (YM) et des géloses favorisant la croissance des hétérotrophes (NG).*

1. Prélever un échantillon homogène du milieu à analyser (bouillon) à l'aide d'une pipette stérile;
2. Transférer le contenu dans une mini éprouvette, sous la hotte stérile;
3. Mettre 900 µl d'eau saline dans 7 mini éprouvettes ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ );
4. Dans la première éprouvette, ajouter 100 µl du bouillon et agiter avec la micropipette (pipetter et rejeter successivement le contenu). Il s'agit de la dilution  $10^{-1}$ ;
5. Prendre 100 µl de la dilution  $-1$  et l'ajouter à la prochaine mini éprouvette contenant 900 µl d'eau saline. Agiter avec un nouvel embout stérile.
6. Répéter les étapes 4 et 5 jusqu'à la dilution  $-7$ ;
7. Pour chaque dilution, prélever 100 µl et l'étaler sur une gélose YM à l'aide de la pipette pliée et du tourne-disque. Rincer la pipette à l'éthanol entre chaque opération et la passer au brûleur. La laisser refroidir avant de faire un autre étalement (on peut aussi travailler avec plusieurs pipettes: pendant qu'une refroidit, on utilise une autre);
8. Faire 3 étalements pour chaque dilution. Répéter la procédure et faire des étalements sur 3 géloses NG. Les dilutions obtenues vont de  $10^{-2}$  à  $10^{-8}$ ;
9. Sceller les géloses identifiées avec de la paraffine et les incuber à 30°C;
10. Suivre la croissance (normalement 2 ou 3 jours) et faire les décomptes. Ne compter que les pétris contenant entre 30 et 300 colonies. Calculer les unités formant les colonies (UFC).
11. Observer au microscope les colonies, afin de différencier les bactéries des levures ou les colonies entre elles.

### 4. REFERENCES

VANDEMARK, P. J., et BATZING, B.L. (1987). The microbes : an introduction to their nature and importance. Menlo Park, CA.

### 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Des décomptes furent réalisés sur un milieu de production à base de mélasse non raffinée et d'huile végétale usée. Ce milieu fut employé pour une production de 80 litres de solution de biosurfactants sous conditions non stériles. Les résultats obtenus n'ont révélé aucune croissance de bactéries dans le milieu, cependant deux autres levures ont crû en parallèle de *C. bombicola*. Les décomptes exécutés au temps 0 de production (avant inoculation avec *C. bombicola*) ont montré la présence d'une seule de ces levures étrangères (2 log). Au bout de 10 jours de fermentation, *C. bombicola* a crû de 9 log, et la première levure étrangère de 6 log. La seconde levure étrangère a augmenté sa concentration de 7 log. Ces levures croissent plus rapidement (2 jours) sur géloses que *C. bombicola* (3 jours).

Pour trouver l'origine de la contamination, des décomptes ont été réalisés sur les substrats utilisés et sur de l'extrait de levure. Ces composés ont d'abord été incubés en milieu liquide pour favoriser la croissance des microorganismes afin qu'ils soient en assez grande concentration pour les décèler sur géloses. 20 ml de milieu YM stérile liquide fut préparé et mis dans un erlenmeyer de 125 ml stérile pour chaque substrat. 1% (p/v) de

substrat servit d'inoculum et ces préparations furent incubées à 30°C, 150 rpm jusqu'à apparence trouble ou sept jours maximum. Ensuite 100 µl de chacune de ces cultures furent étalées sur des gélose YM et NG et incubées à 30°C.

Les résultats n'ont montré aucune croissance de microorganismes à partir de l'huile usée et de l'extrait de levure. Par contre, deux types de levures, croissant sur les milieux NG et YM provenaient de l'étalement de mélasse non raffinée.

## 6. ANNEXES: MODIFICATIONS





PROTOCOLE EXPERIMENTAL	
Protocole #: P3I	Pages:
Version: 1	Date Début
	Date fin

Auteurs: Muriel Gueissaz-Teufel  
Approuvé par:

Signatures:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Titre: Lavages de sol en mode cuvée

Mots clés: Lavage, sol, biosurfactants, agitation, température, TPH

## 1. OBJECTIF(S)

Évaluer la faisabilité du lavage de sol avec des solutions de biosurfactants (PE#P3B) et étudier l'effet de la température de lavage et de la concentration en biosurfactants sur l'efficacité d'enlèvement. Comparer les résultats avec des lavages réalisés avec le Witconol SN-70, sous ses meilleures conditions expérimentales déterminées lors de l'exécution du protocole P1A.

## 2. MATERIELS

- Appareil à 4 postes d'agitation (Phipps & Bird, modèle 7790-100);
- Bain thermostaté;
- 4 béchers en pyrex de 600 ml;
- Witconol SN-70 (0,5%v/v);
- Solution de biosurfactants produits par *Candida bombicola* ATCC22214 (protocole P3B);
- Sol contaminé tamisé à 1 mm et contaminé à 13 400 mg/kg en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub><sup>1</sup>:
  - C<sub>10</sub>-C<sub>19</sub> : 3400 mg/kg
  - C<sub>20</sub>-C<sub>29</sub> : 5000 mg/kg
  - C<sub>30</sub>-C<sub>39</sub> : 3400 mg/kg
  - C<sub>40</sub>-C<sub>50</sub> : 1600 mg/kg

<sup>1</sup> Provenance: site de raffinerie, contamination originale.

### 3. METHODOLOGIE

#### RAPPELS

Les conditions de base des lavages découlent des résultats obtenus lors de l'exécution du PE#PIA (autre projet) où les conditions expérimentales de lavage étaient évaluées pour différents surfactants synthétiques. Les conditions étudiées étaient la température de lavage, la vitesse d'agitation, le pourcentage de sol dans la solution, le pourcentage de surfactant synthétique et l'aération.

Les résultats ont montré que le Witconol SN-70 était le meilleur surfactant synthétique (entre le Witconol, l'Aquaquick et le SDS) pour ce type de contamination. Ils ont également montré une température optimale de lavage à 50°C (par rapport à 21°C et 90°C) et que l'augmentation de l'agitation de 100 rpm à 300 rpm n'avait pas d'effet significatif. Un faible pourcentage de sol (15% p/v) est plus efficace. Dans un autre projet (r.f. PFE K. Lussier), il fut déterminé que quatre cycles de lavage entrecoupés de 24 heures de décantation étaient plus efficaces que s'ils étaient combinés à des étapes de rinçage.

#### METHODOLOGIE

1. Chauffer le bain thermostaté à 50°C et y placer les solutions qui serviront au lavage, afin qu'elles soient à la même température;
2. Mettre 3 x 22 g de sol sec dans trois béchers de 600 ml;
3. Ajouter 125 ml de solution de lavage dans chaque bécher;
4. Placer les béchers dans le bain thermostaté, de façon à ce qu'ils ne bougent pas avec l'agitateur;
5. Ajuster l'agitateur presque au fond du bécher;
6. Agiter vigoureusement durant 10 secondes (200-300 rpm) pour initier un bon mélange;
7. Ajuster la vitesse des agitateurs à 150 rpm et agiter les suspensions de sol durant 30 minutes;
8. Laisser décanter le sol lavé durant 24 heures et soutirer la solution de lavage à l'aide d'une pipette (mesurer le volume retiré);
9. Répéter les étapes 3 à 8, en ajoutant le même volume de solution de lavage que le volume retiré à l'étape 8);
10. Après le quatrième cycle, retirer la solution lavante avec une pipette, bien mélanger le sol lavé et le déposer dans un pot pour analyse des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>;

### 4. REFERENCES

LEGROS, R., PANNETON, C., ROBERGE, F. et SAMSON, R. (1995). Projet sur le lavage des sols contaminés aux hydrocarbures et aux métaux. Montréal (Québec), Centre de développement technologique. École Polytechnique de Montréal.

SELVAKUMAR, A., MAJ., RAY, A. et BORST, M. (1995). "How to Choose the Right Surfactant. Screen Various Products to Find the Best Solution." *Soils(Mars)*: 32-36.

## 5. RESULTATS ET RECOMMANDATIONS

Des essais de lavages ont été complétés à partir de la solution de biosurfactants provenant du 9<sup>ième</sup> jour de production de l'expérience R02. Les essais, réalisés en triplicata, comparent les effets liés à la concentration en biosurfactants et à la température de lavage.

La matrice des essais de lavages avec les solutions de surfactants figure au tableau 1, en fonction de la température de la solution de lavage. Les concentrations résiduelles totales en C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol lavé sont données pour chaque essai (moyenne de triplica). Des analyses de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> sur l'huile végétale utilisée pour la production de biosurfactants (qui n'est pas entièrement consommée et demeure présente dans les solutions de lavage brutes) ont montré qu'elle est formée de composés de polarité semblable aux C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>. En effet, des concentrations allant de 27 000 µg/ml à 52 000 µg/ml de C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> ont été détectées dans deux différentes huiles végétales. Avec le protocole d'analyse actuel (GC-FID, laboratoire externe), il n'y a donc pas de distinction entre les hydrocarbures pétroliers et les composés non-polaires de l'huile végétale. Comme l'huile végétale peut aussi s'adsorber sur les particules de sol, il est possible que les fortes concentrations détectées, notamment pour les lavages à 50°C, soient dues à l'huile végétale dans le sol.

Tableau 1: matrice des essais de lavage avec biosurfactants et résultats.

% sol <sup>m</sup> de surfactants <sup>1</sup> (v/v)	21°C Conc. dans le sol lavé (mgC <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> /kg sec)	50°C Conc. dans le sol lavé (mgC <sub>10</sub> -C <sub>50</sub> /kg sec)
0	-	12 433 ± 1474
0,5 WITCO SN-70	1 757 ± 203	2 010 ± 327
15	13 375 ± 856	19 590 ± 417
40	1 440 ± 405	11 527 ± 4700
70	1587 ± 496	12 155 ± 9709
100	1420 ± 365	14 955 ± 6809

<sup>1</sup> Si non spécifié autrement, les solutions de surfactants sont des solutions de sophorolipides produites en réacteur de 80 litres, à partir de glucose et d'huile végétale. La concentration de la solution est de 70 g/l de sophorolipides et 45 g/l d'huile végétale (4,5% p/v) non consommée par les microorganismes.

La figure 1 présente des résultats de lavage à 50°C à diverses concentrations de biosurfactants. Les C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> ont été fractionnés en 4 plages pour les analyses. Durant ces essais de lavage, le mélange de la solution de biosurfactants et du sol formait un complexe ("gâteau") et le sol avait quasi triplé de volume. Il fut donc décidé en cours de route de rincer, à la dernière étape du lavage (4<sup>e</sup> cycle), le sol avec de l'eau. Au contact de l'eau, la matrice se dénaturait et le sol retrouvait ses propriétés initiales (sablonneux). Les résidus étaient alors facilement récupérés sous forme de flocons (une étape qui serait réalisée, au niveau industriel, par le biais d'une unité de flottation). Par contre, on observe que les échantillons rincés à l'eau ont été presque entièrement lavés des hydrocarbures lourds, se situant même au voisinage du critère A du MEF (100 mg/kg). En absence de rinçage, le lavage avec les biosurfactants n'est pas efficace, et l'on voit que des C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub> sont apportés par l'huile végétale, notamment en comparant les concentrations en C<sub>40</sub>-C<sub>50</sub> dans le sol initial et dans le sol lavé.

Suivant ces observations, on suppose que la solution de biosurfactants telle que produite, chauffée à 50°C et utilisée pour ce sol, n'est pas thermostable. Dans d'autres essais (résultats non présentés), où les biosurfactants étaient produits à partir d'huile végétale pure et de dextrose, le phénomène de "gâteau" n'a pas eu lieu. Les biosurfactants semblent donc, comme les surfactants synthétiques, relativement spécifiques.

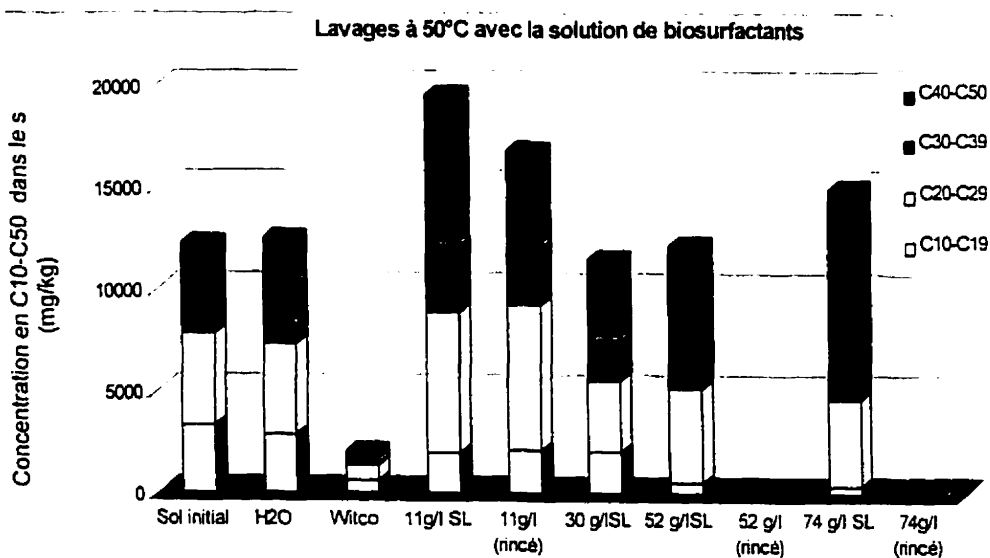


Figure 1.

Les mêmes essais de lavages ont été répétés à 21°C (température ambiante). À cette température, la solution de lavage et le sol ne réagissent pas pour former un gâteau, il n'y a pas formation de lourde matrice. Un rincage a été effectué pour voir son influence. On voit que toute augmentation de la concentration en biosurfactants au-delà de 30 g/l n'augmente pas la désorption des hydrocarbures (figure 2). Les résultats obtenus montrent clairement que les solutions de lavage sont efficaces dans ces conditions.

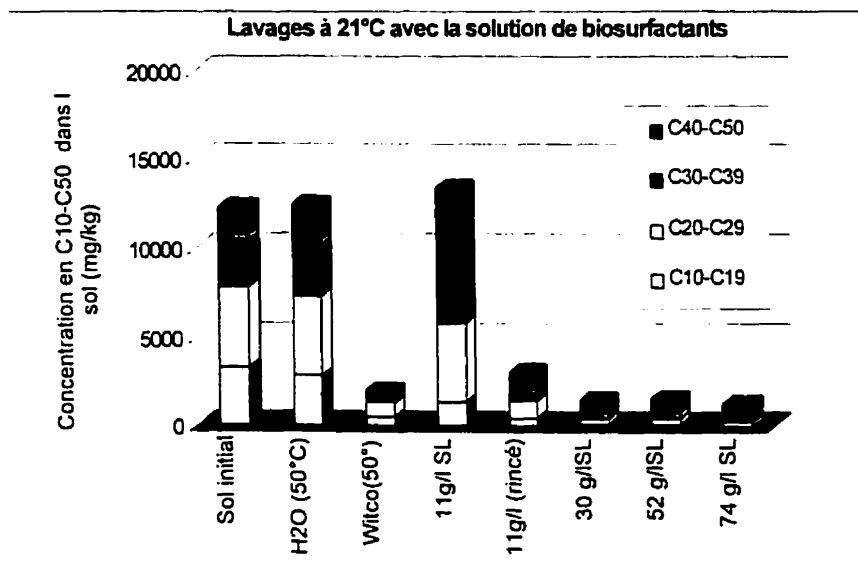


Figure 2.

Lors d'essais de lavage avec témoin, l'huile végétale s'est montrée comme un excellent solvant lourd pour la désorption des hydrocarbures lourds adsorbés sur le sol. Des essais supplémentaires de lavage ont été réalisés à diverses concentrations d'huile végétale usée (figure 3) à 50°C. Les résultats permettent d'évaluer la contribution de l'huile végétale dans l'enlèvement des hydrocarbures lourds, pour une solution brute de biosurfactants donnée. Quelques lavages à 21°C ont montré que la désorption est moins importante qu'à 50°C.

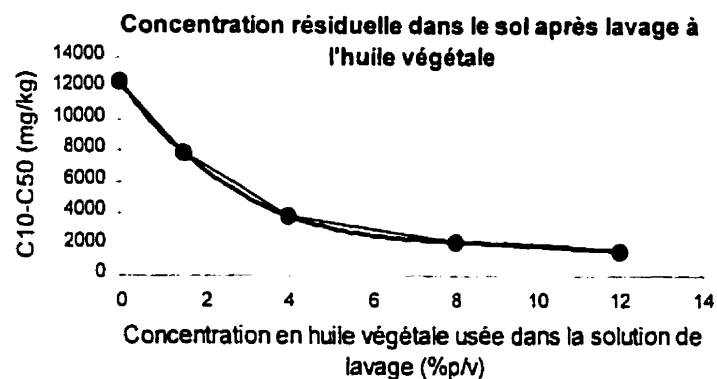


Figure 3

**6. ANNEXES: MODIFICATIONS**

METHODE D'ANALYSE  
DES MILIEUX ENVIRONNEMENTAUX

SOLS - DOSAGE DES HYDROCARBURES PÉTROLIERS (C<sub>10</sub> A C<sub>50</sub>)

PRÉLIMINAIRE

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec		
N° 410 - HYD. 1.0	Date d'émission 1995-09-14	Date de révision —

AVIS

Du fait de la nouveauté de la méthode et dans le but de vérifier son applicabilité et sa fiabilité, la Direction des laboratoires du ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec demande aux utilisateurs et utilisatrices de la présente méthode d'exercer un esprit critique en ce qui a trait à tous les aspects qui les intéressent. Vous êtes priés de nous faire part, d'ici le 15 décembre 1995, de tous commentaires et toutes suggestions susceptibles d'améliorer ou de modifier la présente méthode.

S.V.P. faire parvenir vos commentaires à l'attention de monsieur Germain Tremblay à l'adresse suivante:

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec  
Direction des laboratoires  
850, boulevard Vanier  
Saint-Vincent-de-Paul (Québec) H7C 2M7  
Téléphone: 1-514-664-1750  
Télécopieur: 1-514-661-8512



PRÉPARÉ PAR: .....

APPROUVÉ PAR: .....

☐ : Indique l'endroit où les modifications ont été effectuées.

Historique de la méthode:

Cette méthode a été rédigée dans le cadre de la politique de réhabilitation des terrains contaminés.

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	----	1 de 12

## MODIFICATIONS EFFECTUÉES À PARTIR DE LA DERNIÈRE ÉDITION

SECTION	PAGE	CORRECTION EFFECTUÉE	DATE EFFECTIVE de la correction

RÉVISÉ PAR: .....

## Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec

N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	2 de 12

## INTRODUCTION

Les hydrocarbures sont des composés organiques à base de carbone et d'hydrogène provenant de la distillation du pétrole. Ils peuvent être linéaires (paraffines), ramifiés (iso-paraffines), cycliques (naphènes), aromatiques ou oléfiniques (contenant un ou plusieurs liens doubles).

Les produits pétroliers sont des mélanges complexes qui peuvent contenir des centaines d'hydrocarbures différents, tous, dans des concentrations variables et dont plusieurs sont non identifiés. Par exemple, la composition de l'essence fraîche varie selon l'origine du pétrole brut de départ, le procédé de fabrication ou le grade et peut contenir plusieurs centaines de produits différents allant du propane aux composés aromatiques ayant dix carbones de même que certains additifs. Bien que les produits pétroliers contiennent des traces de composés polaires tels les mercaptans, les alcools, les phénols, les indoles, les pyrroles, etc, les produits pétroliers sont constitués majoritairement d'hydrocarbures non polaires.

Les produits pétroliers sont utilisés généralement comme carburant, lubrifiant ou diluant.

Lorsque rejeté dans l'environnement, les constituants du produit pétrolier sont altérés via des mécanismes de biodégradation, d'évaporation, de lixiviation... et présentent, à l'analyse, des patrons chromatographiques tout à fait différents de ceux des mélanges frais puisque les composés observés après la dégradation correspondent aux fractions les plus persistantes du mélange original.

### **1. DOMAINE D'APPLICATION**

Cette méthode s'applique au dosage des hydrocarbures dans les sols contaminés avec des produits pétroliers.

Le domaine de linéarité du dosage au GC-FID se situe entre 0 et 5 mg/mL d'hydrocarbures pour la solution-étalon.

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	3 de 12

## 2. PRINCIPE ET THÉORIE

L'échantillon solide est d'abord déshydraté avec du sulfate de magnésium anhydre puis extrait avec de l'hexane à l'aide d'un bain à ultrason. Par la suite, du gel de silice est ajouté à l'extrait afin d'adsorber la presque totalité des substances polaires puis le surnageant est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

La concentration des hydrocarbures présents dans l'échantillon est déterminée en comparant la surface totale de l'ensemble des pics résolus et non résolus se situant entre n-C<sub>10</sub> et n-C<sub>50</sub> avec la courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions.

## 3. FIABILITÉ

Pour la définition des termes suivants, se référer au document vocabulaire.

### 3.1 INTERFÉRENCES

- Tout composé, autre que les hydrocarbures, solubles dans l'hexane et répondant au détecteur à ionisation de flamme peut entraîner une surestimation de la concentration des hydrocarbures.
- Les résidus lourds du pétrole peuvent contenir une portion non soluble dans l'hexane.

### 3.2 LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection 100 mg/kg d'hydrocarbures pétroliers C<sub>10</sub> à C<sub>50</sub>.

### 3.3 LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est de 300 mg/kg d'hydrocarbures pétroliers C<sub>10</sub> à C<sub>50</sub>.

### 3.4 SENSIBILITÉ

Un microlitre d'une solution-étalon de 1 mg/mL montre une surface d'environ 8 000 000.

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	4 de 12

### 3.5 FIDÉLITÉ

#### 3.5.1 Répliquabilité

La répliquabilité d'une série de mesures ( $N_1 = 14$ ) est de  $\pm 20$  mg/kg à une concentration de 800 mg/kg et de ( $N_1 = 12$ )  $\pm 30$  mg/kg à une concentration de 2 560 mg/kg en hydrocarbures pétroliers  $C_{10}$  à  $C_{50}$ .

#### 3.5.2 Répérabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

#### 3.5.3 Reproductibilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

### 3.6. JUSTESSE

La justesse ne peut être déterminée puisqu'il n'existe pas de matériel de référence pour la teneur en hydrocarbures pétroliers  $C_{10}$  à  $C_{50}$  dans les sols.

### 3.7 RÉCUPÉRATION

Aucune donnée statistique n'est disponible.

## 4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Prélever un minimum de 100 grammes d'échantillon représentatif dans un contenant de verre exempt de contaminant.

Conserver l'échantillon à environ 4°C si l'analyse est effectuée en moins de sept (7) jours; sinon conserver l'échantillon à -20°C. Le délai de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder 6 mois.

## 5. APPAREILLAGE

- 5.1 - Une balance dont la sensibilité est de 0,01 g.
- 5.2 - Un bain à ultrason dont la puissance est d'environ 350 watts.
- 5.3 - Un agitateur à culbutage (100 rotations à la minute).
- 5.4 - Un système d'évaporation sous jet d'azote avec aiguilles (optionnel).

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec

N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	—	5 de 12

- 5.5 - Un chromatographe en phase gazeuse muni d'un injecteur "on column" afin d'éliminer l'effet de discrimination de masse et fonctionnant avec un débit constant tout le long de la programmation de température (le débit à 35°C doit être le même qu'à 300°C). Le chromatographe est couplé à un détecteur à ionisation de flamme.
- 5.6 - Un injecteur automatique.
- 5.7 - Une colonne chromatographique capillaire de type SPB-1 d'une longueur de 15 m, d'un diamètre interne de 0,53 mm dont la phase est d'une épaisseur de 0,15  $\mu$ m munie d'une pré-colonne de 0,5 m et de diamètre interne de 0,53 mm.
- 5.8 - Un système informatisé de traitement de données.
- 5.9 - Une imprimante.
- 5.10 - Bouteilles de 40 mL claires en verre de borosilicate type 1, classe A avec septa de silicone TFE 22 mm et bouchons appropriés.
- 5.11 - Distributeur automatique de 50 mL gradué à 1 mL.

## 6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

Les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire.

- 6.1 - Hexane de qualité Omnisolv distillé dans le verre, approprié pour la spectrophotométrie et la chromatographie, vérifié pour l'absence d'hydrocarbures entre n-C<sub>10</sub> et n-C<sub>50</sub>.
- 6.2 - n-Décane (n-C<sub>10</sub>)
- 6.3 - n-Pentacontane (n-C<sub>50</sub>)
- 6.4 - Sulfate de magnésium, MgSO<sub>4</sub>.

Traiter le sulfate de magnésium en le chauffant à 650°C pendant une nuit; laisser refroidir au dessiccateur à la température de la pièce et mettre dans un contenant en verre fermé.

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	6 de 12

- 6.5 - Gel de silice (60-200 mesh),  $\text{SiO}_2$ , grade 62.

Traiter le gel de silice en le chauffant à  $110^\circ\text{C}$  pendant une nuit; laisser refroidir au dessiccateur à la température de la pièce et mettre dans un contenant en verre fermé.

- 6.6 - Solution pour déterminer la fenêtre de dosage ( $n\text{-C}_{10}$  et  $n\text{-C}_{50}$ ).

Dissoudre 1,5 mg de  $n\text{-C}_{50}$  dans environ 70 mL d'hexane, immerger cette solution dans un bécher d'eau chaude et placer dans le bain à ultrason pendant 20 minutes. Ajouter 2,0  $\mu\text{L}$  de  $n\text{-C}_{10}$  et compléter à 100 mL avec de l'hexane.

- 6.7 - Solution-étalon 5 mg/mL

Utiliser la solution de diesel altéré à 50% (Diesel fuel # 2) à une concentration de 5000  $\mu\text{g/mL}$  de la compagnie Restek.

- 6.8 - Solution d'étalonnage

A partir de la solution-étalon mère de diesel (6.7), préparer une série de solutions-étalons avec de l'hexane; les concentrations suggérées sont 1,0 , 0,1 et 0,02 mg/mL.

## 7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

### 7.1 PRÉPARATION DE LA VERRERIE

- La décontamination préalable, à l'hexane, du matériel utilisé est indispensable.

### 7.2 EXTRACTION DES HYDROCARBURES

- Homogénéiser et triturer tout l'échantillon à l'aide d'une spatule ou cuillère dans un contenant approprié. Éliminer le matériel (roche, bois...) dont les dimensions sont supérieures à environ 5 mm. Il est recommandé d'utiliser du matériel jetable. Si l'analyse des composés volatils est demandée, prélever un sous-échantillon avant de procéder à cette étape d'homogénéisation.
- Dans une bouteille de 40 mL, peser, à 0,01 g près, 5 grammes d'échantillon et noter le poids.
- Ajouter 2,5 grammes de sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) anhydre préalablement traité.

N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	7 de 12

- Triturer avec une tige de verre jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.
- Ajouter, au distributeur automatique, 20 mL d'hexane.
- Mettre au bain à ultrason pendant 10 minutes en s'assurant que le niveau d'eau dans le bain soit égal ou supérieur au niveau d'hexane dans les bouteilles d'extraction.
- Ajouter 1,5 grammes de gel de silice directement dans la bouteille contenant l'extrait.
- Brasser 10 minutes au moyen de l'agitateur à pulbutage.
- Avec une pipette Pasteur, prélever le surnageant et le transférer dans une bouteille de dosage.
- Avec chaque série d'échantillon, appliquer les éléments de contrôles de qualité définis dans le document intitulé "Lignes directrices concernant l'application des contrôles de qualité en physico-chimie, SCA-01".

### 7.3 DOSAGE

- Les conditions chromatographiques sont les suivantes:

Température initiale:	35°C
Temps d'équilibre:	2 minutes
Programmation de température:	30°C/min
Température finale :	300°C
Temps final :	10 minutes
mode d'injection:	"on column"
Gaz vecteur:	Hélium
Pression :	2,7 psi à 35°C (débit constant)
Volume d'injection:	1 µL
Type de colonne:	SPB-1

- Injecter trois fois de l'hexane afin de s'assurer de la stabilité de la ligne de base et conserver le dernier chromatogramme comme valeur de bruit de fond. Soustraire la surface de ce chromatogramme de la surface des chromatogrammes obtenue autant pour les étalons que pour les échantillons.
- Injecter la solution n-C<sub>10</sub>/n-C<sub>50</sub> (6.6) afin de déterminer la fenêtre d'intégration.

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	—	8 de 12



Injecter les solutions étalons (0,02 à 5 mg/mL) afin d'établir la courbe d'étalonnage.

Procéder à l'injection des échantillons en suivant la séquence suivante:

1. Blanc
2. Éléments de contrôle (matériel de référence, duplicata, replica, etc)
3. Extraits des échantillons (maximum 10)
4. Étalon de 1 mg/mL
5. Reprendre au blanc s'il y a lieu

Intégrer l'ensemble des pics résolus et non résolus de 0,5 minute avant le n-C<sub>10</sub> à 0,5 minute après le n-C<sub>50</sub> en s'assurant que l'intégration commence et finisse à la ligne de base.

#### 7.4 CONCENTRATION DE L'EXTRAIT SI NÉCESSAIRE

- Transférer 5 mL d'échantillon dans une éprouvette conique de 15 mL calibrée à 1 mL.
- Faire suivre un témoin constitué de 5 mL d'hexane.
- Concentrer sous un jet d'azote jusqu'à un volume de 1 mL.
- Doser de nouveau (voir 7.3).

#### 8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats d'analyse sont obtenus à l'aide d'un système informatisé de traitement de données.

Tracer la courbe d'étalonnage: surface obtenue pour chacune des solutions-étalons (soustraite de la surface du bruit de fond) en fonction de la concentration des étalons de 0 à 5 mg/mL.

Les résultats sont exprimés en mg/kg d'hydrocarbures pétroliers (C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>) d'après l'équation suivante:

$$C = \frac{A \times B}{D} \times F$$

où

Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	----	9 de 12

- C: Concentration des hydrocarbures pétroliers (C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>) contenus dans l'échantillon (mg/kg)
- A: Concentration des hydrocarbures pétroliers (C<sub>10</sub>-C<sub>50</sub>) dans la solution dosée déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage (mg/mL)
- B: Volume final de la solution dosée (mL)
- D: Poids d'échantillon utilisé (g sur base sèche)
- F: Facteur de dilution ou de concentration de la solution dosée, si nécessaire.

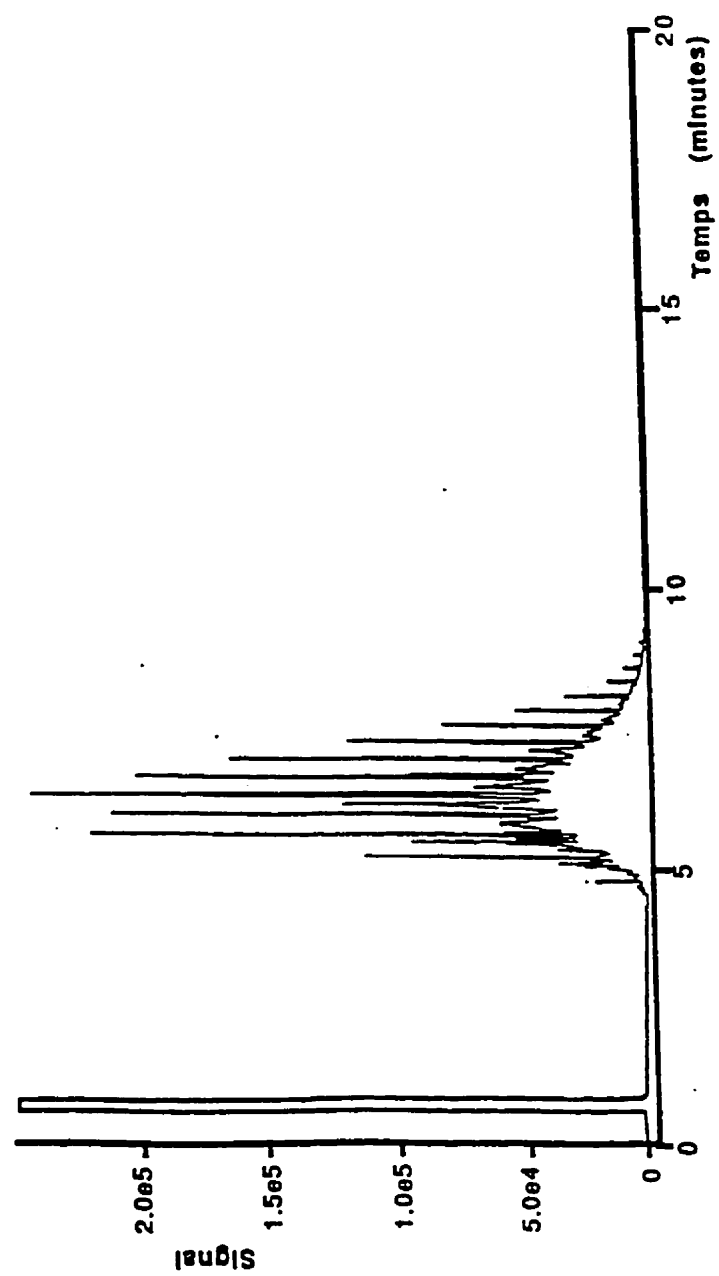
Exprimer les résultats en mg/kg de matière sèche en tenant compte du pourcentage d'humidité déterminé sur un autre sous-échantillon.

#### 9. BIBLIOGRAPHIE

- Problématique des sols et des eaux souterrains contaminés par des produits pétroliers: sélection des paramètres analytiques, Direction des programmes de gestion des déchets et des lieux contaminés, ministère de l'Environnement, novembre 1993.
- Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en physico-chimie, SCA-01, Direction des laboratoires, ministère de l'Environnement et de la Faune, juin 1995 (préliminaire).
- Politique de réhabilitation des terrains contaminés, Direction des substances dangereuses, ministère de l'Environnement, février 1988.
- Vocabulaire, ministère de l'Environnement, MENVIQ. 95.05/000-Math. 1.1

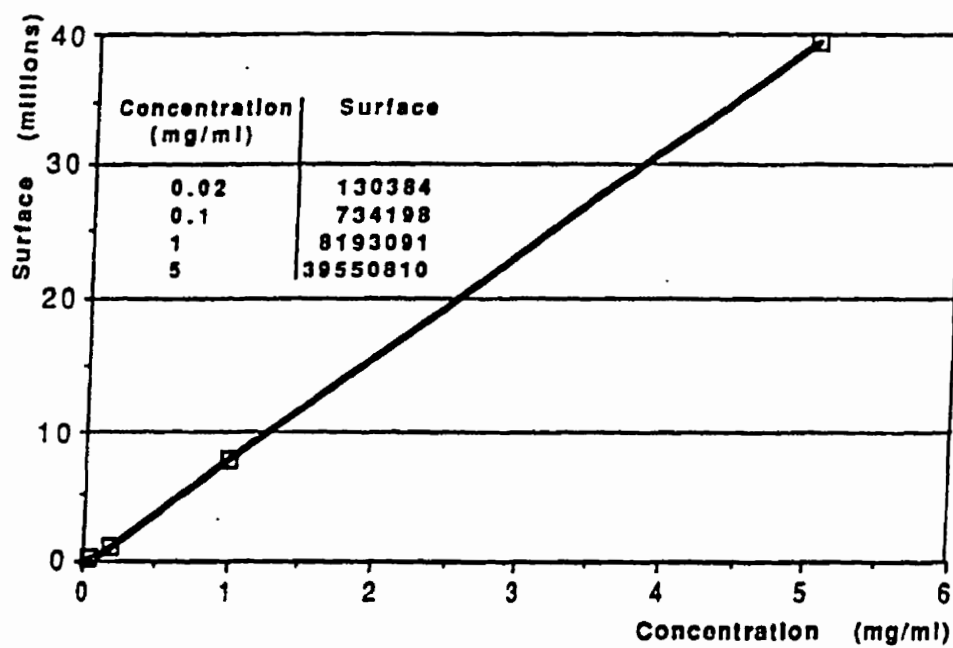
Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec			
N°	Date d'émission	Date de révision	Page
410 - HYD. 1.0	1995-09-14	---	10 de 12

# SOLUTION ÉTALON (1 mg/ml)



## COURBE D'ÉTALONNAGE

Diésel Restek altéré à 50%



**ANNEXE B****GRANULOMÉTRIE DU SOL**

