

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Laboratoire de Géo Environnement et Développement des Espaces

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies et Communications Microbiennes

Intitulée

Effet des biosurfactants microbiens dans la remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) au sein des sols contaminés.

Présentée par : Mr. BERKAT Samir

Le 15/07/2025

Devant le jury :

Président	ELOUALI Fatima	Professeur	Université de Mascara
Examineur	DJIBAOUI Rachid	Professeur	Université de Mostaganem
Examineur	DERICHE El Hadj	MCA	Université de Chlef
Examineur	AIT ABDESLAM Arezki	MCA	Université de Mascara
Encadreur	MELIANI Amina	Professeur	Université de Mascara
Co-Encadreur	NAIR Samira	MCA	Université de Mascara

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّنْ نَّشَأٍ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ﴾

يوسف: ٧٦

﴿إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ﴾

القمر: ٤٩

﴿وَكُلَّ شَيْءٍ فَصَّلْنَاهُ تَفْصِيلًا﴾

الإسراء: ١٢

﴿وَمَا يُلْقَاهَا إِلَّا الَّذِينَ صَبَرُوا وَمَا يُلْقَاهَا إِلَّا ذُو حَظٍّ

عَظِيمٍ﴾

فُصِّلَتْ: ٣٥

﴿تِلْكَ الدَّارُ الْآخِرَةُ نَجْعَلُهَا لِلَّذِينَ لَا يُرِيدُونَ عُلُوًّا فِي

الْأَرْضِ وَلَا فَسَادًا وَالْعَاقِبَةُ لِلْمُتَّقِينَ﴾

القصص: ٨٣

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à :

Mes chers parents ;

Mes chers frères et mes chères sœurs ;

Toute la famille de BERKAT ;

Mes amis ;

Tous mes enseignants depuis l'école primaire jusqu'à ce jour ;

Et Mes collègues.

Samir

Remerciements

*Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à **ALLAH** qui m'a donné la force, le courage, la patience, et la volonté afin de réaliser ce travail.*

*En tout premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma grande reconnaissance à ma directrice de thèse, **Prof. Amina MELIANI**, Chef de Formation Doctoral en Biotechnologie 2018/2019, pour sa confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de cette étude, pour aussi l'opportunité qu'elle m'a offerte, ainsi que pour son soutien et sa disponibilité. Merci de m'avoir donné la chance de travailler sur un sujet qui m'a passionné. Son expertise et son support tout au long de mes travaux ont été grandement profitables. Cette thèse représente le fruit de ses persévérances, sa rigueur scientifique, et sa gentillesse durant la réalisation de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude pour son aide permanente. Merci infiniment pour votre soutien et votre encouragement.*

*Mes sincères remerciements à **Madame Dr. Samira NAIR** pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de co-encadrer ce travail, ainsi que pour ses précieux conseils, son aide, ses suggestions concernant la rédaction de cette thèse et la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de cette étude. Merci infiniment, Madame.*

*Je tiens à remercier sincèrement **Madame Prof. Fatima ELOUALI**, qui m'a honoré en acceptant d'être présidente du jury d'évaluation de ce travail de thèse.*

*Je remercie vivement, **Monsieur Prof. Rachid DJIBAOUI**, pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être rapporteur et de juger ce travail.*

*Je remercie vivement **Monsieur Dr. El Hadj DERICHE**, d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que pour ses précieuses suggestions, et son aide.*

*J'exprime vivement ma reconnaissance à **Monsieur Dr. Arezki AIT ABDESLAM**, d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à **Prof. Malika MEZIANE**, Directrice du Laboratoire de Bioressources Naturelles (LBRN), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Hassiba Benbouali de Chlef, pour m'avoir accueilli au sein de LBRN et m'avoir permis d'utiliser le matériel dont elle est responsable.*

*Mes sincères remerciements à **Prof. Mohamed CHAMKHA**, Directeur du Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE), Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie, qui m'a permis de réaliser un stage au sein du LBPE-Sfax, et de m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux de recherche se rapportant sur l'étude de la biodégradation des HAPs, dans d'excellentes conditions scientifiques. Merci pour vos orientations et vos conseils enrichissants.*

*Une mention toute particulière pour **Dr. Mouna BOUASSIDA, et Dr. Meriam CHEFFI**, Post-doctorantes au Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE), Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie, pour leur soutien, leur patience, leur gentillesse et leur disponibilité à chaque fois que j'ai sollicité leur aide.*

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les membres et le personnel du Laboratoire de recherche en Géo-Environnement et Développement des Espaces (LGEDE), Equipe Biotechnologie Microbienne et Environnement (BME), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mustapha Stambouli de Mascara, Laboratoire de Bioressources Naturelles (LBRN), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Hassiba Benbouali de Chlef, et Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE), Centre de Biotechnologie de Sfax.

*Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à toute l'option de Biotechnologies et Communications microbiennes 2018/2019. Je ne peux pas oublier de remercier très profondément mes collègues **Dr. Samia ALIANE**, et **Dr. Hibat Errahmen MAZARI**, pour leur soutien, leur gentillesse, ainsi que pour leurs multiples encouragements.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes chers collègues chimistes, **Dr. Benamar BAROUDI**, **Dr. Toufik BENSAFI** et **Dr. Boualem ALLOUCHE**, pour les précieux moments que nous avons partagés tout au long de ce parcours. Leur aide, leur soutien indéfectible, ainsi que les connaissances en chimie organiques que j'ai pu acquérir grâce à eux, ont grandement enrichi mon expérience scientifique et humaine. Merci du fond du cœur.*

Je tiens enfin à remercier, sans exception, tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail.

Publications et Communications

1. Publications internationales

- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Meriam Cheffi, Mouna Bouassida, Samia Aliane, Hibat Errahmen Mazari, Samira Nair, Malika Meziane, Sami Sayadi, Mohamed Chamkha. 2025. Hydrocarbon biodegradation by strain BSP4 isolated from a wastewater treatment plant: insights into rhamnolipid production and characterization. *International Journal of Environmental Science and Technology*.
- Samia Aliane, Amina Meliani, **Samir Berkat**, Hibat Errahmen Mazari, Youcef Bouhadda, Abdesselem Si Mohammed. 2024. Behavioral Responses to Hydrocarbon Stress in Marine Bacteria Isolated from Arzew Harbor in Northwestern Algeria. *Jordan Journal of Earth and Environmental Sciences*. 15(3): 146-155.
- Hibat Errahmen Mazari, Amina Meliani, **Samir Berkat**, Samia Aliane, Rachid Djibaoui, & Kaddour Boudroua. 2024. Washing of heavy metal-contaminated soils using pyoverdine extracted from plant growth-promoting bacteria *Pseudomonas lactis* and *P. atacamensis*. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*. 19(1):160–178.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Hibat Errahmen Mazari, Samia Aliane. 2022. Microbial biosurfactants: prospects of sustainable molecules with promising applications in bioremediation, review article. *Environ Exp Biol*. 20(3):155–164. doi:10.22364/eeb.20.14. <http://doi.org/10.22364/eeb.20.14>.

2. Communications internationales

- **Samir Berkat**, Hiba Errahmen Mazari, Samia Aliane, Amina Meliani. Antimicrobial activity of bio-amphiphilic rhamnolipids produced from hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains, The First International Seminar on Biology, Physiology and Pathophysiology (ISBBP 2023), October 18-19, 2023, Chlef, Algeria.
- **Samir Berkat**, Hiba Errahmen Mazari, Samia Aliane, Amina Meliani. The ability of some *Pseudomonas* strains to degrade crude oil and polyaromatic hydrocarbons using microbial biosurfactants, The First International Conference on Water and Environment ICWE'2022, 25th - 26th SEPTEMBER 2022, Mascara, Algeria.

- **Samir Berkat**, Samia Aliane, Hibat Errahmène Mazari et Amina Meliani. New study on characterization and extraction of microbial biosurfactant from contaminated soil with potential application in bioremediation 1st International Symposium on INDUSTRIAL ENGINEERING, MAINTENANCE AND SAFETY IEMS 22 Held on March 05-06th, 2022 in Oran, Algeria.
- **Samir Berkat** and Amina Meliani. Evaluation of biosurfactant producing bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soil involved in bioremediation strategies, The First International Conference on Renewable Energy Advanced Technologies and Applications October 25-27, 2021, Research Unit for Renewable Energies in Saharan Region, Adrar.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Samira Nair, Samia Aliane et Hibat Errahmène Mazari. Microbial biosurfactant-assisted bioremediation produced by indigenous bacteria isolated from contaminated soil, First International Conference on Geo-Sciences & Environment, Mascara, Algeria, September 25 & 26, 2021.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Samia Aliane, Hibat Errahmène Mazari. Isolation and characterization of rhamnolipid producing *Pseudomonas* isolated from polluted soil in Mascara region, 1st International E-Day on Microbial Biotechnology held online on November 18th, 2021 in Algeria.
- **Samir Berkat**, Samia Aliane, Hibat Errahmène Mazari et Amina Meliani. Effect of biosurfactants on the biodegradation, sorption and solubilisation of pollutants, Conférence Internationale sur les Sciences et Génie des Matériaux et leurs Impacts sur l'Environnement (ICMSE-19), 26-28 novembre 2019, in Sidi Bel-Abbès, Algeria.
- Mazari Hibat Errahmen, **Berkat S**, Aliane S, Zatout A, Meliani A, Djibaoui R. Uses of *Pseudomonas pyoverdina* in the bioremediation of heavy metals polluted soil, The 1st International hybrid conference on Climate Change, Georesources and Sustainable Development "1st I2CGSD 2022", Khenchela University.
- Aliane Samia, Meliani A, Mazari H.E, and **Berkat S**. Native biofilm-forming bacteria as promising approach for sea water bioremediation, the 1st international Days of Nature and Life Sciences (INDNS 2022) (Webinaire).

3. Communications nationales

- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Samira Nair, Samia Aliane et Hibat Errahmène Mazari. Assessment of the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons

using microbial biosurfactants, Conférence nationale sur l'environnement et le développement Durable (CNEDD-20), 22-23 Janvier 2020, Mascara.

- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Samira Nair, Samia Aliane et Hibat Errahmène Mazari. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains isolated from contaminated soil, the Second National Webinar on Biodiversity, Biochemistry & Environmental Microbiology held in the university of Laghouat on 17th Octobre 2021.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani, Samira Nair, Samia Aliane et Hibat Errahmène Mazari. Potential applications of microbial biosurfactants in bioremediation of hydrocarbon contaminated soils, 1ER SÉMINAIRE NATIONAL EN GÉNIE DES PROCÉDÉS SNGP2021.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani, et Samira Nair. Recent applications of microbial biosurfactants as Biocontrol agents, 1ere journée nationale d'entomologie et de parasitologie, 11 Mars 2020, Université de Mascara.
- **Samir Berkat**. Environmental applications of biosurfactants, journée d'étude sur le Génie des procédés : Enjeux, Défis et perspectives, 18 Juin 2019, Université de Mascara.
- **Samir Berkat**, Amina Meliani and Samira Nair. Effect of microbial biosurfactants on the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soils, 5th GESD Laboratory Scientific Day, University of Mascara on march 15th 2022.
- Hibat Errahmen Mazari, Samia Aliane, **Samir Berkat**, Asma Zatout, Amina Meliani, Rachid Djibaoui. Uses of *Pseudomonas* siderophores in the bioremediation of copper polluted soil, 1er Séminaire national sur Biodiversité, Biotechnologie et Développement Durable (BB & DD 2022), 16 Avril 2022, Université de Ghardaia.
- Aliane Samia, Mazari Hibat Errahmen, **Berkat Samir**, and Meliani Amina. The potential of native bacterial communities for enhanced bioremediation of contaminated seawater, la 1ere journée Nationale sur L'AGROALIMENTAIRE et MICROBIOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT (AAME 2022).

Liste des abréviations

ADH : L-arginine
ADI : Acide adipique
AK : Amikacine
AMC : Amoxicilline + acide clavulanique
AML : Amoxicilline
AMP : Ampicilline
ARA : L-arabinose
ATCC : American Type Culture Collection
ATM : Aztréoname
BaP : Benzo[a]pyrene
BH : Bushnell and Haas
BLAST : Basic local alignment search tool
BMH : Bouillon Muller Hinton
BSs : Biosurfactants
BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, et les Xylènes : p-, m-, et o-
CAP : Acide caprique
CLCI : Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC : Concentration micellaire critique
CMI/CMB : Concentration minimale inhibitrice/bactéricide
CRO : Ceftriaxone
CTX : Céfotaxime
DAs : Déchets alimentaires
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthanes
DMSO : Diméthylsulfoxyde
E24 : Indice d'émulsification
ESC : Esculine en présence de fer
ETP : Ertapénème
FC : Acide fusidique
FEP : Céfépime
FLUA : Fluoranthène
HAPs : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCH : Hexachlorocyclohexane
HCU : Huile de cuisson usée
IMI : Imipenème
IPM : Imipenème
GC-FID : Gas chromatography with flame ionization detection
GC-MS : Gas chromatography-mass spectrometry
GEL : Gélatine
GLU : D-glucose
GMI : Gentamicine
GNT : Gluconate de potassium
KF : Céphalothine
LB : Luria-Bertani

Liste des abréviations

MAL : D-maltose
MAN : D-mannitol
MLT : Acide malique
MNE : D-mannose
MB : Milieu de base
MDR : Multidrug-resistant
MEGA : Molecular evolutionary genetics analysis
MRHG : Méthode de recouvrement à base d'hydrocarbures sur gélose
NAG : N-acétylglucosamine
NAP : Naphtalène
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NMR : Nuclear magnetic resonance
NPs : Nanoparticules
PAC : Acide phénylacétique
PNG : 4-nitrophényl- β -D-glucopyranoside
PRL : Pipéracilline
PTE : Potentially toxic elements
QS : Quorum sensing
SD : Standard deviation
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SFM : Société Française de la Microbiologie
SXT : Triméthoprime – sulfaméthoxazole
T : Souche type
TC : Tétracycline
TDH : Test de déplacement d'huile
TEG : Test d'effondrement de goutte
TH : Test hémolytique
TOB : Tobramycine
TRP : L-tryptophane
TS : Tension de surface
USEPA : United states environmental protection agency

Liste des tableaux

Tableau 1 : Majeures hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), leurs structures chimiques, et toxicité [105].	19
Tableau 2 : Les principales applications de rhamnolipides.	69
Tableau 3 : Mélange réactionnel de différentes réactions PCR.	80
Tableau 4 : Programme utilisé pour la réaction de la PCR.	80
Tableau 5 : Résultats de différents tests de pré-identification de souches isolées.	96
Tableau 6 : Profil biochimique des isolats par galerie API 20NE.	98
Tableau 7 : L'étude phylogénétique des souches sélectionnées selon le séquençage de ARNr 16S.	99
Tableau 8 : Profil de résistances de quelques souches isolées.	101
Tableau 9 : Résultats de différents tests qualitatifs de souches isolées.	107
Tableau 10 : Production de biosurfactants par la souche BSP4 sur milieu BN enrichi avec différents substrats.	112
Tableau 11 : Production de biosurfactants par la souche BSP9 sur milieu de base (MB) enrichi avec différents substrats.	115
Tableau 12 : Comparaison de dégradation des HAPs par BSP4 et BSP9 avec peu d'autres souches bactériennes rapportées.	135
Tableau 13 : Efficacité de biodégradation de <i>P. aeruginosa</i> BSP4 cultivé dans un milieu Bushnell Haas enrichi avec du pétrole brut à 1% (v/v) après incubation à 150 tr/min et 30 °C, pendant 21 jours.	138
Tableau 14 : Croissance de la souche BSP9 en présence de différents hydrocarbures.	143
Tableau 15 : Activité antimicrobienne, valeurs CMI et CMB du BS-BSP9 contre les souches pathogènes.	148
Tableau 16 : Composition des milieux de culture.	210

Liste des figures

Figure 1 : Sources des polluants dans la nature [38].....	6
Figure 2 : Sources de contamination de l'environnement par les métaux lourds et mécanismes de toxicité des métaux lourds [266].....	15
Figure 3 : Sources naturelles et anthropiques de HAP dans l'environnement [111].	22
Figure 4 : Les plantes utilisent divers mécanismes pour remédier aux PTE dans le sol [216].....	39
Figure 5 : Concentration critique en micelles (CMC) et formation de micelles par les agents tensioactifs biologiques [266].....	44
Figure 6 : Mono-rhamnolipid (a), Di-rhamnolipid (b), Sophorolipide lactonique (c), Sophorolipide acide (d), et Surfactine (e) [417].	45
Figure 7 : Remobilisation des métaux lourds par des biosurfactants microbiens [32].	49
Figure 8 : Un processus simplifié d'activité des biosurfactants pour une meilleure compréhension de la bioremédiation des hydrocarbures dans le sol [32].....	51
Figure 9 : Principes de l'application microbienne assistant la récupération du pétrole [32].	53
Figure 10 : Structure chimique des deux principaux types de rhamnolipides. [374].....	56
Figure 11 : Voie de biosynthèse des rhamnolipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [352].	58
Figure 12 : Les gènes régulant le système quorum-sensing chez <i>P. aeruginosa</i> [524].	59
Figure 13 : Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la biosynthèse de rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> [352].....	61
Figure 14. Localisation géographique des sites d'échantillonnage : Station d'épuration des eaux usées de la ville de Mascara (a), Station d'épuration des eaux usées de la ville de Chlef (b), et la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine (c).	74
Figure 15 : Aspects macroscopiques des <i>P. aeruginosa</i> sur gélose au cétrimide (a), gélose nutritive (b), gélose au cétrimide sous UV à 366 nm (c), milieu King A (d), LB liquide (f), et milieu au rouge Congo (e).....	93
Figure 16 : Aspect microscopique après coloration de Gram (grossissement X1000).	93
Figure 17 : Un arbre phylogénétique, construit selon la méthode du neighbor-joining avec une échelle de 0,02 substitutions par position de nucléotide des séquences ARNr 16S choisies de la famille des <i>Pseudomonadaceae</i> , trouvées grâce	

à BLAST, montre les relations entre les souches isolées et quelques isolats remarquables.	100
Figure 18 : Résultat du test d'antibiogramme de la souche BSP9.	100
Figure 19 : Caractérisation des rhamnolipides basée sur : l'indice E24 (comparé au BN comme contrôle négatif et au SDS (1%) comme contrôle positif) (a), test hémolytique (b), test de déplacement d'huile (comparé au BN comme contrôle négatif) (c), test de gélose au CTAB (d), test d'effondrement de goutte (e), et test de superposition d'hydrocarbures sur gélose (f).....	105
Figure 20 : Screening quantitatif, basé sur l'activité d'émulsification (E24) et la réduction de la tension de surface (TS), des souches isolées de différents sites pollués.....	110
Figure 21 : Évaluation de la production de rhamnolipides par la souche BSP4 en présence de divers substrats : huile d'olive (a), huile de friture usée (b), glycérol (c), kérosène (d), pétrole brut (e) et huile moteur usée (f).....	113
Figure 22 : Les biosurfactants produits à partir d'huile de friture usée (a), résidus d'huile de thon (b), huile d'olive (c), et glycérol (d).	116
Figure 23 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) du biosurfactant Rhl-BSP4.....	117
Figure 24 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) du biosurfactant BS-BSP9.....	118
Figure 25 : Spectres RMN du rhamnolipide brut Rhl-BSP4 : (a) RMN ¹ H et (b) RMN ¹³ C.....	119
Figure 26 : Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) du rhamnolipide brut Rhl-BSP4.....	120
Figure 27 : Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) du rhamnolipide brut BS-BSP9.....	121
Figure 28 : Effet de la concentration de NaCl sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).....	123
Figure 29 : Effet de la température sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).....	124
Figure 30 : Effet du pH sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).....	125

Figure 31 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP4 dans le milieu BH contenant du naphthalène (200 mg L⁻¹) à 150 tr/min et 30 °C, en comparaison avec témoin abiotique (CA), par mesure de DO à 600 nm. 127

Figure 32 : Profils GC-MS des résidus de naphthalène dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP4 à 150 tr/min et 30 °C, pendant 7 jours, par rapport au témoin abiotique. 128

Figure 33 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP9 (ligne continue) sur un milieu basal contenant 200 mg L⁻¹ de (a) naphthalène, (b) phénanthrène, et (c) fluoranthène, à 37 °C et 150 tr/min, par mesure de densité optique (DO) à 600 nm et de tension de surface (TS), par rapport au témoin biologique (ligne discontinue). 130

Figure 34 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du naphthalène (200 mg L⁻¹) par la souche BSP9, à 37 °C et 150 tr / min, en fonction du temps (0, 1 et 3 jours). 131

Figure 35 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du phénanthrène (200 mg L⁻¹) par la souche BSP9, à 37 °C et 150 tr/min, en fonction du temps (0, 3 et 7 jours). 132

Figure 36 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du fluoranthène (200 mg L⁻¹) par la souche BSP9, à 37 °C et 150 tr/min, en fonction du temps (0, 3 et 7 jours). 133

Figure 37 : Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v) par la souche BSP4 (a), à 30 °C, après 21 jours d'incubation, en comparaison avec un témoin abiotique (b). 136

Figure 38 : Profils GC-MS des résidus de pétrole brut dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP4 (a) à 150 tr/min et 30 °C, pendant 7 jours, par rapport au témoin abiotique (b). 137

Figure 39 : Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v) par la souche BSP9 (a), à 37 °C, après 10 jours d'incubation, en comparaison avec un témoin abiotique (b). 137

Figure 40 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP4 dans le milieu BH contenant du pétrole brut (1%, v/v) à 150 tr / min et 30 °C, en comparaison avec témoin abiotique (CA), par mesure de DO à 600 nm. 139

Figure 41 : Profils GC-MS des résidus de pétrole brut dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP9 (b) à 150 tr/min et 37 °C, pendant 10 jours, par rapport au contrôle abiotique (a). 141

Figure 42 : Activité antimicrobienne du rhamnolipide isolé Rhl-BSP4 *vis-à-vis* des souches pathogènes à différentes concentrations (100%, 50% et 25%), en utilisant le

DMSO (à gauche), l'ampicilline et la gentamycine (à droite) comme témoins négatifs et positifs, respectivement. L'astérisque indique $p < 0,05$ par rapport au témoin négatif (DMSO). (**** $< 0,0001$)..... 145

Figure 43 : Activité antimicrobienne du rhamnolipide isolé BS-BSP9 *vis-à-vis* des souches pathogènes à différentes concentrations (50, 25 et 12,5 mg l⁻¹..... 146

Figure 44 : Détermination de la CMI du rhamnolipide isolé Rhl-BSP4 contre quatre souches pathogènes. Après 24 h d'incubation, 20 µl de solution de colorant au chlorure de triphényltétrazolium (5 mg mL⁻¹) (TTC) ont été ajoutés à chaque puits. La colonne 12 confirme qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la préparation de microplaque. La concentration la plus élevée incorporée dans la plaque était de 50 mg mL⁻¹ (colonne 1) et la plus faible obtenue par double dilution en série était de 0,1 mg mL⁻¹ (colonne 11). 147

Figure 45 : Détermination de la CMI du rhamnolipide isolé BS-BSP9 *vis-à-vis* quatre souches pathogènes. Après 24 h d'incubation, 20 µL de solution de colorant au chlorure de triphényltétrazolium (5 mg mL⁻¹) (TTC) ont été ajoutés à chaque puits. La colonne 12 confirme qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la préparation de microplaque. La concentration la plus élevée incorporée dans la plaque était de 50 mg mL⁻¹ (colonne 1) et la plus faible obtenue par double dilution en série était de 0,1 mg mL⁻¹ (colonne 11). 148

Figure 46 : Effets du rhamnolipide Rhl-BSP4, et de surnageants de la culture BSP4, sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols pollués par pétrole brut et l'huile moteur usée (20%, p/v) en comparaison avec un tensioactif chimique (SDS). Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois réplicats ± écart type. L'astérisque indique $p < 0,05$ par rapport au traitement au Rhl-BSP4 brut. Le dièse indique $p < 0,05$ par rapport au traitement au surnageant acellulaire. (****, #### $< 0,0001$)..... 152

Figure 47 : Récupération du pétrole brut (a) et de l'huile moteur usée (b) des sols pollués *via* l'application de surnageants de la culture de BSP4, de Rhl-BSP4, ainsi que de surfactant chimique (SDS)..... 153

Résumé

Face à l'intérêt croissant porté au développement de solutions vertes pour remédier aux niveaux croissants de contamination environnementale et surtout celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), la présente étude a été menée. L'objectif principal était donc d'évaluer le potentiel d'application environnementale des souches de *P. aeruginosa* provenant de trois sites pollués. D'où trente-huit souches ont été isolées après enrichissement, et identifiées phénotypiquement comme *P. aeruginosa*, alors que 5 souches sur la base de séquençage de l'ARNr 16S comme étant *P. aeruginosa*, avec une similarité élevée de 99,40 à 99,66%.

Dans la deuxième partie de ce travail, les souches isolées ont été soumises à des tests quantitatifs et qualitatifs afin d'évaluer leur capacité à produire les biosurfactants. Par ailleurs, les souches provenant de stations d'épurations des eaux usées ont montré une meilleure performance sur la base de la réduction de la tension de surface ($TS = 32,68 \text{ mN m}^{-1}$) et de l'index d'émulsification ($E24 = 71,25\%$).

Les souches BSP4 et BSP9 ont été sélectionnées pour la production de biosurfactants en utilisant différents substrats (huiles végétales et hydrocarbures), y compris l'huile de friture usée, les résidus d'huile de thon, et le glycérol ; des substrats économiques et durables, réduisant ainsi le coût élevé de production de ces bio tensioactifs. La souche BSP4 a montré une meilleure production sur milieu BN additionné par huile de friture usée (1%, v/v) avec un rendement de $5,09 \pm 0,91 \text{ g L}^{-1}$ après 48 h d'incubation. Cependant, des rendements de $2,36 \pm 0,69$ et $1,70 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$, ont été enregistrés par la souche BSP9 sur milieu de base enrichi avec huile de friture usée et résidus d'huile de thon (1%, v/v) après 48 h d'incubation, respectivement. Au cours de cette étude, il a été constaté que les biosurfactants produits par BSP4 et BSP9 ont été capables de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 32 et 29 mN m^{-1} , à la concentration micellaire critique de 350 et 20 mg L^{-1} , respectivement. En fait, leur stabilité a été notée sur une large gamme de températures (-80–120 °C), de salinité (2–12% Na Cl) et de pH (2–12). Les analyses IRTF et RMN ont également confirmé la nature rhamnolipidique des biosurfactants produits.

Par ailleurs, les analyses structurales de biodégradation (CG–SM et CG–DIF), ont montré un potentiel significatif *vis-à-vis* des hydrocarbures aromatiques polycycliques et du pétrole brut. En effet, la souche BSP4 a dégradé 97% du naphthalène (200 mg L^{-1}) après sept jours d'incubation, avec une biodégradation importante de 4,82% à 83,91 % des principaux *n*-alcanes dans le pétrole brut (1%, v/v) après 21 jours. De plus, BSP9 a pu dégrader 83,25% du naphthalène (200 mg L^{-1}) en seulement 3 jours d'incubation, ainsi que 27,7 et 68,33% de dégradation du phénanthrène (200 mg L^{-1}) et du fluoranthène (200 mg L^{-1}), respectivement, au bout de 7 jours, et une grande capacité à métaboliser les *n*-alcanes du pétrole brut (1%, v/v), atteignant un taux de biodégradation de 86,28% après 10 jours d'incubation.

De plus, le biosurfactant produit par BSP4 (Rhl-BSP4) s'est avéré plus efficace que le tensioactif chimique (SDS) testé pour remobiliser les hydrocarbures contenus dans des sols pollués. L'activité antimicrobienne a été mise en évidence puisque ces biosurfactants ont montré des données prometteuses contre les souches pathogènes, avec des valeurs de CMI de 1,562 à 12.5 mg mL^{-1} et des CMB allant de 6,25 à 25 mg mL^{-1} .

Ces résultats encourageants dévoilent que les souches isolées BSP4 et BSP9, ainsi que leurs biosurfactants, présentent un intérêt biotechnologique pour diverses applications, telles que la bioremédiation des sites contaminés par des hydrocarbures, ainsi que d'autres domaines tels que la médecine, l'agriculture, etc.

Mots clés : Pollution ; HAPs ; *P. aeruginosa* ; Biosurfactant ; Rhamnolipids; Biodégradation.

ملخص

في ظل الاهتمام المتزايد بتطوير حلول خضراء لمعالجة التلوث البيئي، تهدف هذه الدراسة إلى تقييم إمكانية التطبيق البيئي للسلاسل البكتيرية المنتجة للمركبات الحيوية الخافضة للتوتر السطحي، تم عزلها من ثلاثة مواقع ملوثة. تم عزل 38 بعد النخيب في وسط غذائي، وتم تحديدها ظاهرياً على أنها سلاسل تابعة للزائفة الزنجارية، من بينها تم تحديد 5 سلاسل وفقاً لتسلسل الحمض النووي الريبوزيمي 16S باعتبارها سلاسل تابعة للزائفة الزنجارية بنسب تشابه كبيرة تتراوح بين 99،40 إلى 99،66 بالمائة.

في الجزء الثاني من هذا العمل، تم إخضاع السلاسل المعزولة لاختبارات كمية ونوعية من أجل تقييم قدرتها على إنتاج مخفضات التوتر السطحي. أظهرت السلاسل المعزولة من محطات معالجة مياه الصرف الصحي أداءً أفضل بناءً على انخفاض التوتر السطحي ومؤشر الاستحلاب. بعد ذلك تم اختيار السلالتين BSP4 وBSP9 لإنتاج مخفضات التوتر السطحي باستخدام ركائز مختلفة (الزيوت النباتية والهيدروكربونات)، بما في ذلك نفايات زيت الطهي وبقايا زيت معلبات التونة والجليسيرول، وهي ركائز اقتصادية ومستدامة، وبالتالي تقليل التكلفة العالية لإنتاج المركبات الخافضة للتوتر السطحي. أظهرت السلالة BSP4 إنتاجاً أفضل على الوسط الغذائي المكمل ب (1%، حجم/حجم) ببقايا زيت القلي المستخدم، بإنتاجية قدرها $0,91 \pm 5,09$ غراماً/لتر بعد 48 ساعة من الحضنة. تم تحقيق إنتاجية $2,36 \pm 0,69$ و $0,01 \pm 1,70$ غرام/التر بواسطة السلالة BSP9 معتمدين على استعمال ببقايا زيت القلي وبقايا زيت معلبات التونة (1%، حجم/حجم) بعد 48 ساعة من الحضنة.

كانت مخفضات التوتر السطحي التي تنتجها السلالتين BSP4 وBSP9 قادرة على خفض التوتر السطحي للماء من 72 إلى 32 و29 ملي نيوتن/متر، عند تركيز مذيلي حدي قدره 350 و20 ملجم/لتر، على التوالي. في الواقع، تمت ملاحظة ثباتها على نطاق واسع من درجات الحرارة (-120 إلى -80 درجة مئوية)، الملوحة (2-12%)، ودرجة الحموضة (2-12). أكدت تحليلات تقنيّة مطيافية الأشعة تحت الحمراء باستخدام تحويل فورييه والرنين المغناطيسي النووي طبيعة مخفضات التوتر السطحي المنتجة بانتمائهما إلى قسم الرامنوليبيدات.

في جزء آخر من هذه الدراسة، أظهرت تحليلات تقنيّة الكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بمطياف الكتلة وكروماتوغرافيا الغاز المتصلة بكاشف التأين اللهب إمكانية تحلل حيوي مثيرة للاهتمام للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات والنفط الخام بواسطة السلالتين BSP4 وBSP9. قامت السلالة BSP4 بتحليل 97% من النفثالين (200 ملجم/لتر) بعد سبعة أيام من الحضنة، مع تحلل حيوي كبير من 4،82 إلى 83،91% لاهم الألكانات الرئيسية الموجودة في النفط الخام (1%، حجم/حجم) بعد 21 يوماً. علاوة على ذلك، استطاعت السلالة BSP9 على تحليل 83،25% من النفثالين (200 ملجم/لتر) في 3 أيام فقط من الحضنة، بالإضافة إلى تحلل 27،7 و68،33% من الفينانثرين (200 ملجم/لتر) والفلورانثين (200 ملجم/لتر)، على التوالي، بعد 7 أيام، وقدرة عالية على تحليل ألكانات النفط الخام (1%، حجم/حجم)، حيث يصل معدل التحلل البيولوجي إلى 86.28% بعد 10 أيام من الحضنة.

مرة أخرى، أثبتت مخفضات التوتر السطحي الحيوية التي تنتجها السلالة BSP4 أنها أكثر فعالية من نضيرتها الكيميائية التي تم اختبارها في إزالة الهيدروكربونات الموجودة في التربة الملوثة. أيضاً، أظهرت مخفضات التوتر السطحي المنتجة فعالية كبيرة كمضادات للميكروبات خاصة منها ضد السلاسل المسببة للأمراض، حيث تتراوح قيم التركيز المثبط الأدنى من 1.562 إلى 12.5 ملجم/مل والتركيز القاتل الأدنى تتراوح من 6.25 إلى 25 ملجم/مل.

تكشف هذه النتائج المشجعة أن السلالتين المعزولتين BSP4 وBSP9 بالإضافة إلى مخفضات التوتر السطحي الخاصة بهما، تظل ذات أهمية لمختلف تطبيقات التقانة الحيوية، مثل المعالجة الحيوية للمواقع الملوثة بالهيدروكربونات، بالإضافة إلى مجالات أخرى مثل الطب والزراعة وغيرها.

الكلمات الرئيسية: التلوث؛ الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات؛ الزائفة الزنجارية؛ المخفضات الحيوية للتوتر السطحي؛ الرامنوليبيد؛ التحلل الحيوي.

Abstract

Given the growing interest in developing green solutions to address the increasing levels of environmental contamination, the present study aims to evaluate the potential for environmental application of biosurfactant-producing strains of *P. aeruginosa* from three polluted sites. 38 strains were isolated after enrichment on nutrient broth medium, and phenotypically identified as *P. aeruginosa*, while 5 strains were identified based on 16S rRNA sequencing as *P. aeruginosa*, with a high similarity of 99.40 to 99.66%.

In the second part of this work, the isolated strains were subjected to quantitative and qualitative tests to evaluate their ability to produce biosurfactants. Strains from wastewater treatment plants showed better performance based on the reduction of surface tension ($ST = 32.68 \text{ mN m}^{-1}$) and emulsification index ($E_{24} = 71.25\%$). Then, strains BSP4 and BSP9 were selected for biosurfactant production using different substrates (vegetable oils and hydrocarbons), including used frying oil, tuna oil residue, and glycerol, which are economical and sustainable substrates, thus reducing the high production cost of these biosurfactants. Strain BSP4 showed better production on nutrient broth medium supplemented with used frying oil (1%, v/v) with a yield of $5.09 \pm 0.91 \text{ g L}^{-1}$ after 48 h of incubation. Yields of 2.36 ± 0.69 and $1.70 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ were achieved by strain BSP9 on basal medium enriched with used frying oil and tuna oil residues (1%, v/v) after 48 h of incubation, respectively. The biosurfactants produced by BSP4 and BSP9 were able to reduce the surface tension of water from 72 to 32 and 29 mN m^{-1} , at the critical micellar concentration of 350 and 20 mg L^{-1} , respectively. In fact, their stability was noted over a wide range of temperatures (-80–120 °C), salinity (2–12% Na Cl) and pH (2–12). FTIR and NMR analyses also confirmed the rhamnolipid nature of the produced biosurfactants.

In another part of this study, GC–MS and GC–FID analyses showed an interesting biodegradative potential of polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil by strains BSP4 and BSP9. BSP4 degraded 97% of naphthalene (200 mg L^{-1}) after seven days of incubation, with a significant biodegradation of 4.82% to 83.91% of the main n-alkanes in crude oil (1%, v/v) after 21 days. In addition, BSP9 was able to degrade 83.25% of naphthalene (200 mg L^{-1}) in only 3 days of incubation, as well as 27.7 and 68.33% degradation of phenanthrene (200 mg L^{-1}) and fluoranthene (200 mg L^{-1}), respectively, after 7 days, and a high ability to metabolize crude oil n-alkanes (1%, v/v), reaching a biodegradation rate of 86.28% after 10 days of incubation.

Again, the biosurfactant produced by BSP4 (Rhl-BSP4) was found to be more effective than the tested chemical surfactant in remobilizing hydrocarbons contained in polluted soils. Also, the produced biosurfactants showed promising antimicrobial activity against pathogenic strains, with MIC values ranging from 1.562 to 12.5 mg mL^{-1} and MBC ranging from 6.25 to 25 mg mL^{-1} .

These encouraging results reveal that the isolated strains BSP4 and BSP9, as well as their biosurfactants, remain of biotechnological interest for various applications, such as the bioremediation of sites contaminated by hydrocarbons, as well as other fields such as medicine, agriculture, etc.

Keywords: Pollution; PAHs; *P. aeruginosa*; Biosurfactants; Rhamnolipids; Biodegradation.

Table des matières

Liste des figures	xii
Résumé.....	xvi
ملخص.....	xvii
Abstract	xviii
I. Introduction Générale	1
1. Introduction générale.....	1
II. Synthèse Bibliographique.....	4
1. Pollution de l'environnement.....	5
1.1. Introduction	5
1.2. Source des polluants	6
1.3. Pollution de l'eau	6
1.4. Pollution de l'air.....	7
1.5. Pollution du sol.....	7
1.6. Types de polluants	8
1.6.1. Composés organiques	8
1.6.1.1. Pétrole et produits pétroliers	9
1.6.1.2. Polluants agrochimiques	10
1.6.1.3. Polluants pétrochimiques/industriels.....	10
1.6.1.4. Colorants	11
1.6.1.5. Matières plastiques.....	11
1.6.1.6. Antibiotiques et produits pharmaceutiques	12
1.6.1.7. Déchets alimentaires	13
1.6.2. Composés inorganiques	13
1.6.2.1. Anions	13
1.6.2.2. Métaux	14
1.6.2.3. Métalloïdes.....	14
1.6.2.4. Métaux lourds.....	15
2. Hydrocarbures	16
2.1. Introduction	16
2.2. Classification	16

2.2.1. Hydrocarbures insaturés	16
2.2.2. Hydrocarbures saturés.....	17
2.2.2.1. Hydrocarbures mono-aromatiques	17
2.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	18
2.2.2.2.1. Propriétés des HAPs.....	22
2.2.2.2.2. Sources environnementales de HAPs	23
2.2.2.2.3. Toxicité des HAPs.....	24
2.3. Biodégradation des hydrocarbures	25
2.3.1. Biodégradation des hydrocarbures poly-aromatiques	25
2.3.1.1. Biodégradation aérobie	26
2.3.1.2. Biodégradation anaérobie.....	27
2.3.1.3. Biodégradation des <i>n</i> -alcanes.....	28
2.3.2. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures	29
2.3.2.1. Oxygène	30
2.3.2.2. pH.....	30
2.3.2.3. Nutriments.....	31
2.3.2.4. Température	32
2.3.2.5. Biodisponibilité des hydrocarbures	33
2.3.2.6. Concentration de HAPs et toxicité des produits finaux.....	33
3. Bioremédiation.....	35
3.1. Introduction	35
3.2. Biostimulation	36
3.3. Bio augmentation.....	36
3.4. Nano-bioremédiation	37
3.5. Phytoremédiation.....	37
3.6. Applications des micro-organismes en bioremédiation	39
3.6.1. Remobilisation des métaux lourds	40
3.6.2. Biodégradation des produits pétroliers	40
3.6.3. Remobilisation des hydrocarbures poly aromatiques (HAPs)	41
3.6.4. Dégradation du plastique	41
3.6.5. Biodégradation des pesticides.....	42

4. Biosurfactants.....	43
4.1. Introduction	43
4.2. Structure chimique et classification des biosurfactants	44
4.2.1. Glycolipides	45
4.2.2. Lipopeptides	46
4.2.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres.....	46
4.2.4. Biosurfactants polymériques.....	47
4.3. Micro-organismes producteurs de biosurfactants	47
4.4. Applications des biosurfactants dans la biotechnologie environnementale.....	48
4.5. Remobilisations des métaux lourds	48
4.6. Remobilisation des HAPs.....	50
4.7. Récupération microbienne du pétrole (MEOR).....	51
4.8. Bioremédiation des pesticides	53
5. Rhamnolipides.....	55
5.1. Introduction	55
5.2. Structure et classification des rhamnolipides.....	56
5.3. Synthèse des rhamnolipides et voies métaboliques	56
5.4. Régulations génétiques de la biosynthèse des rhamnolipides.....	58
5.4.1. Synthèse des rhamnolipides régulée par le système quorum-sensing.....	59
5.4.2. Ingénierie et amélioration de la production de rhamnolipides	61
5.5. Production de rhamnolipides	62
5.5.1. Microorganismes producteurs de rhamnolipides	62
5.5.2. Facteurs influençant la production de rhamnolipides	63
5.5.2.1. Effet de différents nutriments.....	63
5.5.2.1.1. Carbon	64
5.5.2.1.2. Phosphate	64
5.5.2.1.3. Azote	64
5.5.2.2. Paramètres environnementaux	65
5.5.2.2.1. Effet de la température	65
5.5.2.2.2. Effet du pH.....	65
5.5.2.2.3. Effet de l'agitation	65

5.5.3. Production de biosurfactants à partir de substrats durables et économiques.....	66
5.5.3.1. Production de biosurfactants à partir de déchets agro-industriels et de leurs sous-produits.....	66
5.5.3.2. Production de biosurfactants à partir de déchets industriels.....	67
5.5.3.3. Production de biosurfactants à partir de déchets huileux et à base de glycérol	67
5.5.3.4. Production de biosurfactants à partir de déchets lignocellulosiques	67
5.6. Applications des rhamnolipides.....	68
III. Matériel et Méthodes	71
1. Lieu et période des expérimentations	72
2. Produits chimiques et composition des milieux	72
2.1. Milieux de culture.....	72
2.2. Hydrocarbures, huiles et autres	73
3. Zone d'étude.....	73
3.1. Choix de la zone d'étude	73
3.2. Localisation géographique et caractéristique.....	73
3.3. Echantillonnage	75
4. Isolement des bactéries productrices de biosurfactants	75
5. Caractérisation des <i>Pseudomonas</i>	75
5.1. Caractérisation phénotypique	75
5.2. Caractérisation biochimique	76
6. Caractérisation physiologique	76
6.1. Test de croissance à différentes températures.....	76
6.2. Croissance en présence de milieux avec différents pH.....	76
6.3. Croissance en présence de diverses concentrations de Na Cl.....	77
7. Conservation des isolats purifiés	77
8. Criblage préliminaire des souches productrices de biosurfactants	77
8.1. Méthodes qualitatives	77
8.1.1. Test hémolytique (TH).....	77
8.1.2. Méthode de la gélose au CTAB	78
8.1.3. Test d'effondrement de goutte (TEG)	78
8.1.4. Méthode de recouvrement à base d'hydrocarbures sur gélose (MRGH)	78
8.1.5. Test de déplacement d'huile (TDH)	78

Table des matières

8.2. Méthode quantitative	79
8.2.1. Indice d'émulsification (E24).....	79
8.2.2. Mesure de la tension superficielle (TS)	79
9. Etude phylogénétique	79
9.1. Extraction d'ADN	79
9.2. Amplification de l'ADN 16S.....	80
9.3. Purification des produit PCR.....	81
9.4. Séquençage	81
10. Biosurfactants produits par les souches sélectionnées.....	81
10.1. Tests de production de biosurfactants sur différentes sources de carbone.....	81
10.2. Détermination de la tension de surface (TS)	82
10.3. Test de déplacement d'huile (TDH)	82
10.4. Récupération de biosurfactants.....	82
10.5. Détermination de la CMC.....	83
10.6. Test de la stabilité des biosurfactants	83
11. Activité antimicrobienne de biosurfactants	84
11.1. Activité antimicrobienne sur milieu solide.....	84
11.2. Détermination de la CMI de BSs.....	84
11.2.1. Préparation d'un inoculum standardisé	85
11.2.2. Préparation de plaques à 96 puits.....	85
11.2.3. Détermination de la CMB de BSs.....	85
12. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	85
12.1. Préparation d'inoculum bactérien.....	86
12.2. Application des disques d'antibiotiques	86
12.3. Pré-diffusion et incubation	86
12.4. Lecture des résultats	86
13. Identification structurelle des biosurfactants.....	86
13.1. Analyse par spectroscopie FTIR.....	86
13.2. Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	87
14. Expériences de biodégradation.....	87
14.1. Tolérance des souches productrices de biosurfactants aux divers hydrocarbures	87

Table des matières

14.1.1. Tolérance de la souche BSP4.....	87
14.1.2. Tolérance de la souche BSP9.....	87
14.2. Méthodes analytiques : chromatographiques et spectroscopiques.....	88
14.2.1. Extraction des hydrocarbures.....	88
14.2.2. Chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS) ..	88
14.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)	89
15. Remobilisation des hydrocarbures par les biosurfactants.....	90
16. Analyses statistiques	90
IV. Résultats et Discussion	91
1. Caractérisation des souches isolées	92
1.1. Caractérisation morphologique.....	92
1.1.1. Caractérisation macroscopique	92
1.1.2. Caractérisation microscopique.....	93
1.2. Caractérisation physiologique	94
1.3. Caractérisation biochimique	94
1.4. Caractérisation phylogénétique	99
1.5. Profil de sensibilité et/ou résistance aux antibiotiques	100
2. Production des biosurfactants.....	105
2.1. Tests de screening préliminaires des isolats producteurs de biosurfactants	105
2.1.1. Tests qualitatifs	106
2.1.2. Tests quantitatifs	108
2.2. Evaluation de la production de biosurfactants sur différents substrats	111
2.2.1. Production de biosurfactants par la souche BSP4.....	111
2.2.2. Production des biosurfactants par la souche BSP9	114
2.3. Caractérisation des biosurfactants produits par les souches étudiées	117
2.3.1. Identification structurelle des biosurfactants	117
2.3.1.1. Spectroscopie infrarouge FTIR	117
2.3.1.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton ¹ H RMN	118
2.3.2. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC).....	120
2.3.3. Stabilité des biosurfactants <i>vis-à-vis</i> de la salinité, de la température et du pH.....	122
2.3.3.1. Stabilité <i>vis-à-vis</i> de la salinité.....	122

Table des matières

2.3.3.2. Stabilité <i>vis-à-vis</i> de la température	124
2.3.3.3. Stabilité <i>vis-à-vis</i> du pH	125
3. Etude des potentialités bio dégradatives des bactéries sélectionnées	127
3.1. Biodégradation du naphtalène par la souche BSP4	127
3.2. Biodégradation des HAPs par la souche BSP9.....	129
3.3. Biodégradation du pétrole brut par la souche BSP4	136
3.4. Biodégradation du pétrole brut par la souche BSP9	139
4. Potentialités bio dégradatives sur différents hydrocarbures	143
5. Applications des biosurfactants	145
5.1. Activité antimicrobienne	145
5.2. Remobilisation des hydrocarbures.....	151
V. Conclusion Générale et Perspectives	154
VI. Références Bibliographique.....	159
VII. Annexes	209

I. Introduction

Générale

1. Introduction générale

Avec l'augmentation du taux de pollution vu par notre planète ces dernières années, il est devenu vital de développer des moyens urgents et opportuns pour atténuer ce problème. De même, l'impact de l'internationalisation et les progrès de l'industrialisation ont entraîné le rejet d'énormes quantités de produits chimiques et de polluants [1]. Par la suite, la libération de composés chimiques tels que les produits chimiques industriels, les composés pharmaceutiques actifs, les hydrocarbures poly aromatiques, les produits de soins personnels, les drogues illicites, les herbicides, les pesticides et les surfactants chimiques, qui ne sont pas biodégradables et persistent dans la nature, s'accumulent dans la chaîne alimentaire et constituent une menace accrue pour l'environnement [2,3].

Les hydrocarbures poly-aromatiques (HAPs) ont été reconnus comme une classe importante de contaminants chimiques présentant des risques environnementaux significatifs en raison de leur composition chimiquement stable et de leur biodisponibilité limitée [4]. Ces substances présentent donc des propriétés cancérigènes, toxiques et mutagènes à l'intérieur des organismes biologiques [5]. Les HAPs sont constitués de plusieurs anneaux benzéniques aromatiques fusionnés et présentent des propriétés lipophiles [4]. C'est pourquoi l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA) a inscrit 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques sur sa liste prioritaire en raison de leur impact négatif sur l'écosystème et la santé humaine. Il est important de noter qu'il existe plus de 100 formes distinctes de HAPs [6]. En outre, le diesel et d'autres carburants à base d'hydrocarbures contiennent une quantité importante d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. En raison de l'activité humaine, qui est la principale cause de la pollution par les HAPs, ces substances contribuent de manière significative à la contamination de l'écosystème [7,8]. La quantité des HAPs dans l'environnement présente une variabilité importante, qui peut être attribuée à des facteurs tels que les mécanismes de transport des HAPs dans l'environnement, le degré de pollution industrielle et les caractéristiques des sites pollués [5].

La principale contrainte à la biodégradation des HAPs dans les zones contaminées est leur faible biodisponibilité ainsi que leur solubilité limitée, ce qui est un facteur important qui affecte leur efficacité dans les approches de

bioremédiation [9,10]. C'est pourquoi la remédiation des sites pollués par des HAPs est devenue une priorité absolue pour la société. Au cours des dernières décennies, le développement de solutions *in situ* visant à remédier aux niveaux croissants de contamination de l'environnement a suscité un intérêt croissant [8]. À cette fin, le nouveau domaine de la bioremédiation a ouvert des perspectives de découverte dans le domaine des sciences biologiques, à un moment où l'accent est mis de plus en plus sur les technologies vertes [11]. L'utilisation d'organismes, tels que les plantes et les bactéries, dans le but de biodégrader les contaminants, représente une stratégie rentable, durable et très efficace pour assainir les sols contaminés. Les bactéries sont très répandues dans les environnements contaminés et ces micro-organismes ont la capacité d'adopter divers comportements afin d'exploiter les contaminants [12].

Plusieurs études révèlent que les micro-organismes ont la capacité de synthétiser une large gamme de composés métaboliques qui peuvent éliminer efficacement les contaminants, soit par dégradation chimique directe, soit par conversion des substances dangereuses en intermédiaires moins nocifs [13]. Par exemple, certaines bactéries peuvent libérer des substances actives sur la tension superficielle appelées biosurfactants (BSs). En diminuant la tension superficielle et interfaciale, elles augmentent la biodisponibilité des hydrocarbures, facilitant ainsi leur absorption [9,14,15]. Ces métabolites hydrophobes sont des biopolymères complexes (glycolipides, exo polysaccharides, protéines, acides aminés, acides gras, etc.) aux propriétés amphiphiles [16]. En effet, ces composés amphiphiles biosourcés constituent l'une des caractéristiques adaptatives des micro-organismes, car ils présentent une grande variété de caractéristiques chimiques et de tailles moléculaires [17]. En plus, ils offrent plusieurs avantages, notamment une plus grande capacité de mise à l'échelle, une production rapide et des caractéristiques multifonctionnelles [18].

Les BSs microbiens sont plus efficaces et plus stables [19], considérés comme "verts" du point de vue de l'environnement car ce sont des produits biodégradables, non toxiques et économiques qui peuvent être synthétisés à partir de substrats renouvelables (déchets agro-industriels) [20–22]. Ces qualités cruciales peuvent permettre aux BSs de remplacer certains des surfactants commerciaux qui ont des effets négatifs sur les systèmes biologiques par rapport à leurs homologues biologiques [23,24] et par conséquent, les BSs peuvent être utilisés dans toute une série d'industries, de la biotechnologie à la remédiation environnementale [21]. En

effet, la remarquable stabilité des BSs face aux variations des conditions environnementales indique leur utilité potentielle dans divers domaines, notamment dans les processus industriels et la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures [9,25].

Malgré les nombreux rapports sur les micro-organismes dégradant les hydrocarbures et leur réponse à la contamination de l'environnement, il est crucial de cribler de nouveaux micro-organismes possédant des propriétés améliorées nécessaires à des procédures efficaces de bioremédiation [26]. En plus de cela, les chercheurs sont actuellement attirés par l'exploration de nouveaux BSs qui possèdent certaines qualités de stabilité convenant à des applications industrielles ou environnementales [27,28]. Dans ce contexte, nous avons été intéressés par cette étude de recherche à :

- ❖ L'isolement et le criblage des souches hyperproductrices de biosurfactants.
- ❖ La caractérisation au niveau phénotypique et phylogénétique de *Pseudomonas aeruginosa* productrices de biosurfactants.
- ❖ La production et la caractérisation de ces biomolécules tensioactives.
- ❖ L'étude du potentiel de biodégradation des hydrocarbures, en particulier des structures complexes et poly aromatiques, par des souches sélectionnées de *P. aeruginosa*.
- ❖ Application des biosurfactants : remobilisation des hydrocarbures dans les sols contaminés et activité antimicrobienne.

II. Synthèse

Bibliographique

1. Pollution de l'environnement

1.1. Introduction

Ces dernières années, la communauté scientifique s'est intéressée de plus en plus à la surveillance de l'environnement. Des recherches ont révélé qu'environ 22% des maladies et 23% des décès dans le monde sont attribués à la pollution de l'environnement [29,30]. L'augmentation de la pollution environnementale à l'échelle mondiale, qui affecte les écosystèmes terrestres et aquatiques, peut être attribuée aux facteurs combinés du développement industriel et de la croissance démographique [31].

Les effets néfastes de la pollution sur la santé humaine, le fonctionnement des cycles biogéochimiques, la réduction de la biodiversité et la biosphère dans son ensemble sont devenus des préoccupations majeures pour la société moderne. La prise de conscience de la gravité de ce problème a conduit à l'adoption de mesures visant à lutter contre la contamination de l'environnement à plusieurs niveaux, notamment régional, national et international [31]. On sait que la croissance rapide des industries entraîne la diffusion de divers polluants chimiques dans notre environnement [32,33].

D'un point de vue conceptuel, les polluants peuvent être perçus comme un ensemble de substances chimiques provenant de sources naturelles ou synthétiques. Une fois rejetées dans l'environnement, ces substances peuvent perturber le fonctionnement normal d'un ou de plusieurs éléments d'un habitat ou d'un écosystème bien réglementé [34]. Certains produits chimiques, comme les hydrocarbures pétroliers, existent à l'état naturel mais ont été déplacés en dehors de leur habitat normal grâce à l'intervention de l'industrie chimique [34].

Il est intéressant de noter que divers polluants tels que les composés à activité hormonale, les produits chimiques industriels, les pesticides, les produits de soins personnels, les médicaments et les drogues dopantes posent problème en raison de leur grande stabilité et de leur résistance aux traitements physicochimiques et biologiques [3]. Par conséquent, ces graves problèmes environnementaux causés principalement par le pétrole et les produits pétrochimiques ont incité davantage de chercheurs à travailler dans ce domaine au cours des dernières décennies [35–37].

1.2. Source des polluants

Les principales causes de la pollution environnementale proviennent des activités humaines, qui entraînent la création et le rejet de matériaux dangereux [38]. Bien que des sources naturelles existent, la majeure partie de la pollution est due à des actions humaines augmentant les niveaux d'exposition. En effet, les sources anthropiques émettent plus de substances toxiques dans l'environnement que les sources naturelles (Fig. 1).

Il est crucial d'identifier les sources de polluants pour mettre en place des mesures appropriées afin de réduire leur propagation et atténuer l'impact de ces éléments nocifs [39]. Les contaminants peuvent avoir une origine naturelle, par exemple, provenir de gaz radon, d'éruptions volcaniques, de tremblements de terre, d'inondations et de tempêtes, mais beaucoup résultent de processus industriels [38].



Figure 1 : Sources des polluants dans la nature [38].

1.3. Pollution de l'eau

La qualité de l'eau brute provenant de différentes sources, telles que les eaux de surface, souterraines et les nappes phréatiques, est affectée par divers polluants, y compris les eaux usées industrielles et domestiques, le ruissellement agricole et de nombreux autres facteurs [40]. Par conséquent, il est essentiel de réguler et de préserver la qualité de l'eau de ces différentes sources. La pollution de l'eau est une cause majeure de décès et de maladies à l'échelle mondiale, entraînant de nombreux décès humains chaque jour [41]. Aussi, La qualité de l'eau provenant de différentes

sources est influencée par plusieurs facteurs, les industries étant l'un des principaux responsables de la pollution. Les installations industrielles déversent souvent des eaux usées qui sont soit non traitées, soit traitées de manière inadéquate. Les polluants présents dans ces eaux usées varient considérablement en fonction du type d'industrie [40].

1.4. Pollution de l'air

La pollution de l'air est l'un des défis majeurs de notre époque, non seulement en raison de son rôle dans le changement climatique, mais aussi en raison de ses effets significatifs sur la santé publique et individuelle, entraînant une augmentation des maladies et des taux de mortalité [42]. Pareillement, la pollution de l'air est souvent qualifiée de tueur silencieux de notre époque. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2019, la pollution de l'air extérieur (ambiant) et intérieur (domestique) représente le plus grand risque sanitaire environnemental, causant plus de 7 millions de décès prématurés par an. En 2018, de nouvelles estimations indiquaient qu'environ 90% des personnes respirent un air contenant des niveaux élevés de polluants [43].

La pollution de l'air se compose d'un mélange de particules et de gaz pouvant atteindre des concentrations nocives à l'extérieur comme à l'intérieur. Parmi les polluants courants, on trouve la suie, la fumée, les moisissures, le pollen, le méthane et le monoxyde de carbone. Les particules fines de l'air pollué peuvent pénétrer profondément dans les poumons et atteindre le système cardiovasculaire [44]. Elle affecte de nombreux systèmes d'organes, y compris le système cardiovasculaire en causant des maladies cardiaques, et le système pulmonaire en provoquant le cancer du poumon, la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'asthme et les infections respiratoires. Elle a été liée à des taux d'accidents vasculaires cérébraux plus élevés en raison de son impact sur le système nerveux central [45] et est également considérée comme affectant les systèmes reproducteur [46] et tégumentaire [47,48].

1.5. Pollution du sol

La pollution du sol est définie comme l'accumulation dans les sols de composés toxiques persistants, de substances chimiques, de sels, de matériaux radioactifs ou d'agents pathogènes, ayant des effets néfastes sur la croissance des

plantes et la santé animale [49]. Plusieurs méthodes peuvent mener à la pollution du sol, par exemple : la fuite depuis un dépotoir, le déversement de déchets industriels dans le sol, la percolation d'eau contaminée dans le sol, la rupture de réservoirs de stockage souterrains, l'utilisation excessive de pesticides, herbicides ou d'engrais, la fuite de déchets solides, l'installation, l'explosion ou le démontage inadéquats de munitions.

D'autre part, des recherches antérieures ont établi que la pollution environnementale peut avoir un impact profond sur la variété des microbiotes du sol, la structure de leurs communautés et la formation de groupements écologiques. En outre, il existe une corrélation considérable entre les variations de la contamination et l'abondance et la diversité des communautés microbiennes [50–52]. Les altérations observées dans le microbiote du sol à la suite d'une contamination environnementale devraient avoir une influence significative sur le fonctionnement quotidien de l'écosystème du sol [53].

1.6. Types de polluants

Un polluant est défini comme une substance ou une énergie qui, lorsqu'introduite dans l'environnement, a des effets nuisibles indésirables et peut causer des dommages à court ou à long terme. Ces dommages peuvent se manifester par la modification des taux de croissance des espèces végétales ou animales, ou par une incidence sur la santé et le bien-être humains [38]. Divers composés organiques et inorganiques sont identifiés comme des polluants en fonction de leur carcinogénicité, mutagénicité, tératogénicité potentielles ou connues, ou de leur haute toxicité aiguë [38]. Les polluants sont aussi classés en deux catégories en fonction de leur niveau de concentration : les macropolluants, présents en plus grandes quantités, et les micropolluants, qui existent en concentrations plus faibles [54].

Certains de ces polluants sont décrits plus en détail dans les sections suivantes.

1.6.1. Composés organiques

La contamination de l'environnement par des composés organiques représente un vaste problème environnemental [10]. Les polluants organiques, riches

en carbone, forment une grande variété de composés complexes. Les caractéristiques et le comportement de ces composés dépendent de facteurs tels que la structure, la taille, la forme moléculaire et la présence de groupes fonctionnels [55].

La pollution environnementale causée par des composés organiques toxiques est une préoccupation croissante en raison des activités industrielles. Bien que la production et l'utilisation de nombreux polluants organiques soient désormais restreintes ou interdites, ils sont toujours présents dans des échantillons environnementaux. Dans les pays en développement, le recyclage inapproprié des déchets électroniques est une source majeure de contamination des sols par les polluants organiques [56].

1.6.1.1. Pétrole et produits pétroliers

La contamination pétrolière est un problème environnemental majeur, affectant tant les pays développés que les pays en développement [57]. Elle est principalement causée par l'industrie pétrolière et les services d'entretien de moteurs, qui produisent d'importantes quantités de sous-produits tels que des boues huileuses et des huiles moteur usées [28]. Les hydrocarbures pétroliers, utilisés dans divers domaines comme l'alimentation électrique, le chauffage, les transports et les machines lourdes, peuvent fuir accidentellement à diverses étapes de manipulation, posant ainsi des risques sérieux pour l'environnement [58,59]. De plus, certains hydrocarbures sont parfois rejetés négligemment ou intentionnellement dans l'environnement, aggravant le problème [60]. Leur faible solubilité dans l'eau complique leur décomposition [9].

Ces fuites et rejets d'hydrocarbures causent des dommages considérables aux ressources en eau et en sol. Absorbés par le sol, ils le rendent hydrophobe et infertile, impactant négativement la croissance des plantes et entraînant des problèmes de développement tels que la croissance ralentie et des déformations des racines [61,62]. De plus, ces hydrocarbures pétroliers, identifiés comme des carcinogènes et des mutagènes potentiels [59], peuvent s'accumuler dans les cultures et les organismes aquatiques, et potentiellement pénétrer dans le corps humain, causant divers problèmes de santé [63].

1.6.1.2. Polluants agrochimiques

Les mauvaises herbes, les parasites et les maladies représentent des défis importants dans l'agriculture, entraînant une réduction des rendements et de la qualité des produits agricoles. On estime qu'environ 30 % des produits agricoles subissent des pertes annuelles en raison des parasites [64], ce qui rend l'utilisation de pesticides courante. Cependant, les agrochimiques, tels que les pesticides comme les DDT (dichlorodiphényltrichloroéthanes), le dieldrine, le HCH, l'aldrine et le toxaphène sont devenus une menace importante pour les écosystèmes en raison de leur utilisation excessive [65], affectant sa fertilité et les communautés microbiennes qui y vivent. En raison de leur solubilité dans l'eau, ces composés persistants peuvent s'accumuler dans l'environnement [66], et se disperser verticalement et horizontalement dans le sol et peuvent s'infiltrer dans les eaux souterraines, polluant les sources d'eau. Certains de ces pesticides sont très toxiques pour la vie aquatique, y compris les invertébrés et les poissons [67]. L'utilisation excessive d'agrochimiques, tels que les pesticides, a des répercussions importantes sur la santé humaine. Les individus qui consomment des aliments contenant des résidus de pesticides ou qui sont exposés à de l'eau contaminée par ces substances courent un risque accru de développer divers problèmes de santé, qu'ils soient aigus ou chroniques [68]. Ces problèmes de santé vont des symptômes mineurs, tels que des irritations et des troubles respiratoires, à des conditions graves, notamment le cancer, le diabète et les troubles de la fertilité. Ainsi, l'utilisation incontrôlée d'agrochimiques a des conséquences néfastes sur la santé humaine, soulignant la nécessité de réglementations strictes et de pratiques agricoles durables pour minimiser ces risques [66].

1.6.1.3. Polluants pétrochimiques/industriels

Le phénol et ses dérivés sont des polluants organiques courants dans l'eau, ayant un impact négatif sur la santé humaine et les écosystèmes. Ces composés se trouvent naturellement dans l'eau et sont également produits par des activités humaines. Ils proviennent soit de plantes aquatiques et de microorganismes, soit de la décomposition de matière organique [2]. Les sources humaines incluent les activités industrielles, domestiques, agricoles et municipales, avec des effluents provenant de raffineries de pétrole, de mines, de textiles, de papier, de résines et de

plastiques, de production d'acier, de produits pharmaceutiques, d'agrochimiques et de transformation alimentaire contenant du phénol et ses dérivés [69]. Le phénol est utilisé dans la production d'explosifs, de colorants et de textiles, tandis que d'autres composés phénoliques, comme le chlorophénol et l'aminophénol, sont toxiques pour les animaux, causant divers problèmes de santé [70].

1.6.1.4. Colorants

Les colorants sont largement utilisés dans diverses industries telles que le textile, le cuir, les peintures, les cosmétiques et le papier, et leur demande a augmenté ces dernières années. Les colorants synthétiques, réputés pour leur rentabilité et leur stabilité face à des facteurs tels que la température et la lumière, ont largement remplacé les colorants naturels sur le marché [71]. Cependant, de nombreux colorants synthétiques sont synthétisés à partir de précurseurs carcinogènes, tels que le benzidine et d'autres composés aromatiques [72]. Ces colorants synthétiques rejetés pendant la fabrication, tels que l'orange de méthyle et le bleu de méthylène, sont nuisibles à la vie aquatique et terrestre [67], ainsi que d'autres substances comme les détergents, sont rejetés dans les plans d'eau avec les eaux usées textiles. Ce rejet peut entraver la pénétration de la lumière du soleil, affaiblissant la photosynthèse et réduisant les niveaux d'oxygène dissous dans l'eau, ce qui peut être préjudiciable à la vie aquatique [73]. Par conséquent, l'élimination des colorants est une étape cruciale dans le traitement des eaux usées textiles. Les méthodes physicochimiques traditionnelles utilisées dans l'industrie, telles que l'adsorption et la coagulation, génèrent des déchets secondaires, nécessitant un traitement supplémentaire. Ces limitations ont conduit à un intérêt croissant pour des méthodes biologiques plus propres pour l'élimination des colorants [74].

1.6.1.5. Matières plastiques

Les plastiques, connus pour leur légèreté, durabilité, résistance aux intempéries, faible toxicité et accessibilité, sont largement utilisés dans des secteurs tels que l'emballage, la construction, l'automobile et l'agriculture [75]. La production mondiale de plastiques, qui augmente d'environ 5% par an, devrait atteindre 1,6 milliard de tonnes d'ici 2050 [76]. Cette production et utilisation répandues ont conduit à des problèmes significatifs de déchets plastiques. Rien qu'en 2020, environ 400 millions de tonnes de déchets plastiques ont été générés mondialement, avec des

projections de déchets plastiques totaux dans l'environnement atteignant 12 milliards de tonnes d'ici 2050 [77]. Seulement 28% de ces déchets sont recyclés ou incinérés, le reste finissant dans les décharges ou l'environnement [77]. En raison de leur poids moléculaire élevé, de leur cristallinité et de leurs groupes fonctionnels stables, les plastiques se dégradent lentement, prenant des décennies voire des siècles [78]. L'exposition à l'environnement décompose les déchets plastiques en microplastiques ou nanoplastiques, de plus en plus trouvés même dans les corps humains [79]. Ces déchets posent divers risques environnementaux et biologiques, notamment des menaces pour les microorganismes du sol [80], la perturbation endocrinienne des animaux marins [80], la contamination de la chaîne alimentaire [81] et la propagation d'algues et de pathogènes nuisibles [82].

1.6.1.6. Antibiotiques et produits pharmaceutiques

Ces dernières années, une préoccupation croissante a émergé concernant les effets nocifs des polluants émergents, notamment les composés pharmaceutiques (CP), sur l'environnement. Les produits pharmaceutiques, tels que les médicaments de chimiothérapie et les antibiotiques, polluent également l'écosystème car ils ne sont souvent pas soumis à des procédures de traitement appropriées [1,2]. Les antibiotiques sont couramment utilisés dans l'élevage d'animaux et de volailles pour maintenir la santé des animaux, et ces antibiotiques atteignent directement les eaux de surface par ruissellement lors des précipitations [83]. Les antibiotiques ont suscité une attention considérable parmi les composés pharmaceutiques en raison de leurs effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques et de leur potentiel danger pour la santé humaine [3]. Les antibiotiques et leurs dérivés se caractérisent par leur grande toxicité, leur stabilité et leur capacité à perturber considérablement l'environnement et l'équilibre écologique [84]. Ces antibiotiques sont rejetés en quantités importantes dans les écosystèmes aquatiques par le biais des eaux usées et des déchets animaux, ce qui entraîne d'importants problèmes de pollution de l'eau [1]. Par conséquent, les stations d'épuration des eaux usées ont du mal à éliminer complètement les antibiotiques, ce qui en fait des points chauds de résistance aux antibiotiques. Il est donc impératif d'améliorer les technologies de traitement des antibiotiques dans ces installations [1,3].

1.6.1.7. Déchets alimentaires

Outre les défis écologiques posés par les polluants organiques effluents de l'industrie chimique, les déchets alimentaires (DAs) issus des restaurants et des ménages représentent également une problématique environnementale majeure [85]. Il est estimé qu'en 2025, environ 2,5 milliards de tonnes de DA seront produites mondialement [86]. Les DAs non traités sont à l'origine de diverses nuisances environnementales, telles que la contamination des sols, la production d'odeurs et l'attraction de nuisibles [87]. Une grande partie des DA est souvent mélangée avec des déchets solides municipaux et est principalement éliminée par enfouissement et incinération. Ces déchets incluent fréquemment une quantité importante d'huile de cuisson usée (HCU), dont la présence rend la biodégradation plus complexe. En effet, l'HCU forme une couche sur les DAs, empêchant l'oxygène de pénétrer et inhibant ainsi l'activité des microorganismes aérobies [88]. Il est donc essentiel de séparer l'HCU des DAs pour mieux gérer ces déchets [85].

1.6.2. Composés inorganiques

L'industrialisation et les activités humaines ont mené à l'introduction de polluants inorganiques dans l'environnement, affectant négativement le sol, l'eau et l'air. Ces polluants proviennent de diverses sources, notamment l'industrie chimique, les échappements de véhicules et les activités pétrochimiques, et entraînent la contamination des ressources en eau ainsi que la pollution de l'air. Issus principalement de l'exploitation minière, de l'industrie et de l'agriculture, ces polluants inorganiques ont des effets délétères sur les écosystèmes et la santé humaine, et peuvent causer des problèmes graves tels que le cancer, le diabète et l'obésité [89].

1.6.2.1. Anions

De nombreux polluants inorganiques non toxiques peuvent néanmoins entraîner des problèmes environnementaux s'ils sont utilisés de manière excessive. Par exemple, c'est le cas des engrais à base de nitrates et de phosphates [55]. Lors de la décomposition des plantes, des nitrates sont libérés dans le sol, pouvant enrichir les plans d'eau avoisinants et provoquer une augmentation de la croissance des algues [55]. Ce processus est connu sous le nom d'eutrophisation, et il peut entraîner

une pénurie d'oxygène dans l'eau. L'utilisation de phosphates dans les engrais peut de manière similaire causer l'eutrophisation. De plus, les détergents à lessive constituent une autre source courante de phosphates [55].

1.6.2.2. Métaux

Avec l'avènement de l'ère industrielle, la pollution environnementale par les métaux est devenue une préoccupation majeure pour l'écologie et la santé publique. L'utilisation accrue de ces métaux dans divers secteurs a augmenté l'exposition humaine [55]. Considérés comme polluants en raison de leur non-biodégradabilité et de leur tendance à s'accumuler dans la chaîne alimentaire, ces métaux, qui peuvent être de simples ions inorganiques ou des molécules organiques complexes, sont souvent libérés dans l'environnement par des activités humaines telles que l'exploitation minière et la métallurgie, causant ainsi des dommages écologiques [55].

Avec le temps, l'accumulation des métaux lourds peut réduire la qualité et le rendement des produits agricoles, altérer la qualité du sol et modifier directement ses caractéristiques physico-chimiques [90]. Il est donc crucial de bien comprendre la mobilité et l'accumulation des métaux dans les sols, car ils influencent directement ou indirectement la santé publique via la production alimentaire [55]. Parmi les sources de libération de ces métaux dans le sol figure l'utilisation d'engrais [91]. En outre, des facteurs environnementaux tels que le pH, le potentiel redox, ainsi que la présence de limon, d'argile et de matières organiques sont déterminants pour la disponibilité des métaux [91].

1.6.2.3. Métalloïdes

Les métalloïdes, qui combinent des caractéristiques des métaux et des non-métaux, forment des liaisons covalentes entraînant des risques toxicologiques. Ils créent des composés lipophiles toxiques, tels que le tétraalkyl plomb et le méthylmercure, et peuvent se lier à des parties non métalliques de macromolécules cellulaires [55]. Parmi les métalloïdes, l'arsenic est particulièrement préoccupant. Il existe sous des formes inorganiques et organiques et est présent dans de nombreux produits agricoles. Des millions de personnes dans le monde, notamment dans des

pays avec des eaux souterraines contaminées par l'arsenic, ainsi que les travailleurs de certains secteurs industriels, sont exposés à sa toxicité [92].

1.6.2.4. Métaux lourds

La pollution croissante du sol par des métaux lourds toxiques par bioaccumulation est devenue un risque majeur pour l'environnement et préoccupe les scientifiques du monde entier en raison de leurs effets négatifs et de leurs manifestations toxicologiques [93]. Les métaux lourds sont le principal groupe de contaminants inorganiques, et une large zone de terres est contaminée par eux en raison des activités minières, industrielles, et agricoles (Fig. 2). Bien que les métaux soient présents naturellement dans la croûte terrestre à divers niveaux et que de nombreux métaux soient indispensables aux cellules (comme le cuivre, le fer, le manganèse, le nickel, le zinc), tous les métaux sont toxiques à des concentrations élevées [94].

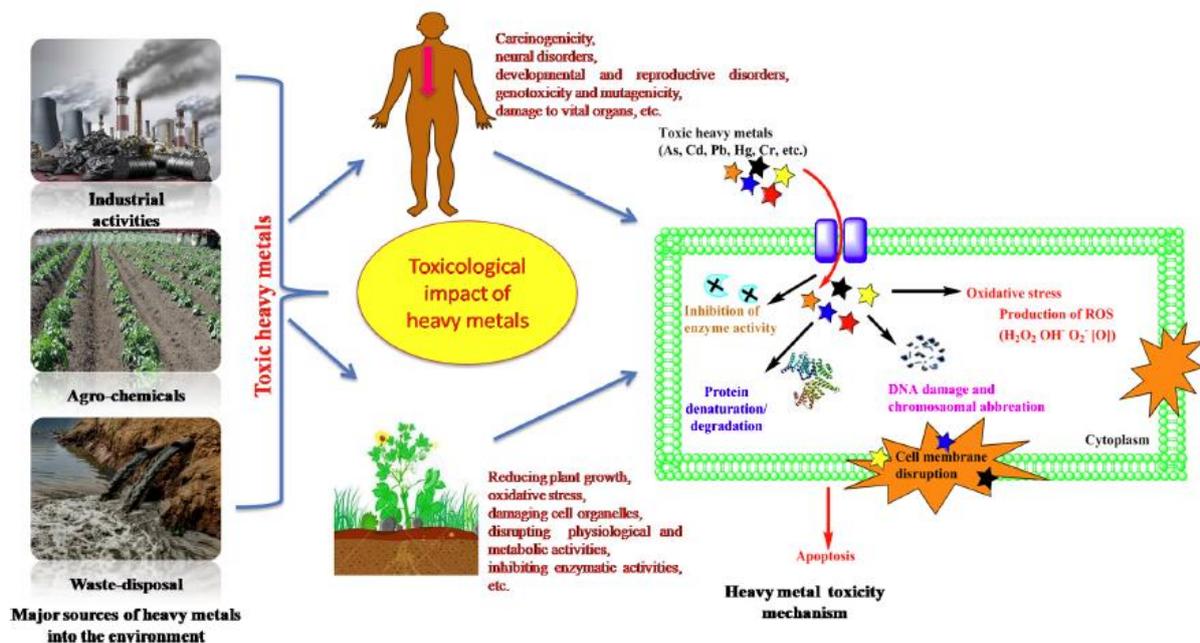


Figure 2 : Sources de contamination de l'environnement par les métaux lourds et mécanismes de toxicité des métaux lourds [266].

2. Hydrocarbures

2.1. Introduction

Les hydrocarbures, comme l'indique leur nomenclature, sont des composés organiques simples constitués exclusivement d'éléments carbone et hydrogène [55,95]. Les hydrocarbures se présentent principalement sous forme de liquides ou de solides, bien que certains d'entre eux, comme le méthane, l'éthane et l'éthylène, se présentent à l'état gazeux dans des conditions normales de température et de pression ambiantes [55]. Les hydrocarbures ont pour caractéristique commune d'être naturellement hydrophobes, ce qui entraîne leur répulsion ou leur expulsion des environnements aqueux. Cette propriété des produits chimiques, souvent appelée *hydrophobie*, tire son nom des mots grecs *hydro* (qui signifie eau) et *phobos* (qui signifie peur). La manifestation physique de l'hydrophobie peut être attribuée aux caractéristiques polaires de l'eau et à la tendance naturelle des molécules d'eau à s'engager dans des liaisons hydrogène les unes avec les autres. L'avantage énergétique de la création de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau dépasse celui de l'interaction entre les molécules d'eau et les molécules non polaires ou les phases qui ne forment pas de liaisons hydrogène [96]. Bien qu'ils possèdent une solubilité notable dans les huiles et une large gamme de solvants organiques, ils ne sont pas très solubles dans les solvants organiques polaires tels que le méthanol et l'éthanol [55]. Malgré leur simplicité chimique, les hydrocarbures sont souvent présents en tant que polluants dans notre environnement. Les problèmes susmentionnés, ainsi que les risques qu'ils représentent pour le bien-être de l'homme, nécessitent la mise en œuvre de mesures correctives [95].

2.2. Classification

La classification des hydrocarbures repose sur leur structure et le type de liaisons chimiques entre les atomes de carbone. On distingue principalement trois grandes catégories : les hydrocarbures saturés (alcane), les hydrocarbures insaturés et les hydrocarbures cycliques.

2.2.1. Hydrocarbures insaturés

Les hydrocarbures insaturés, comprenant des liaisons doubles ou triples entre les atomes de carbone, sont classés en alcènes ou oléfines pour les doubles liaisons,

et en alcynes pour les triples, avec des formes cycliques indiquées par "cyclo". Leur formule générale $C_nH_{2(n+1-r-d-2t)}$ résume leur composition, où "n" est le nombre de carbones, "r" les cycles, "d" les doubles liaisons, et "t" les triples [97]. Les exemples les plus simples sont l'éthène (ou éthylène) et l'éthyne (ou acétylène), utilisés dans divers domaines industriels. Les liaisons doubles conjuguées, telles que celles présentes dans le lycopène ou le bêta-carotène, sont des éléments structuraux clés de certains hydrocarbures naturels, jouant un rôle biologique significatif, notamment dans la photosynthèse et la protection contre les radiations UV [97].

2.2.2. Hydrocarbures saturés

Les hydrocarbures saturés, également connus sous le nom d'alcane, caractérisés par la formule C_nH_{2n+2} . Chaque atome de carbone, à l'exception des extrémités, est lié à deux autres carbones et deux hydrogènes, tandis que les extrémités sont liées à trois hydrogènes [97]. Le méthane est le plus simple de ces alcanes et représente le point de départ d'une série d'homologues. Ils sont nettement moins lourds que les autres hydrocarbures, constituant généralement de 30 à 50% du total des hydrocarbures présents dans un pétrole brut [98]. On y trouve notamment les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}), les alcanes ramifiés, ainsi que les cycloalcanes (C_nH_{2n}). Les alcanes présentent des conformères, des isomères stéréo qui s'interconvertissent par rotation sans rupture de liaison. Leur stabilité dépend des interactions entre les orbitales des atomes adjacents et de la répulsion stérique, permettant une rotation relativement libre des liaisons sigma C–C dans la plupart des environnements naturels [97].

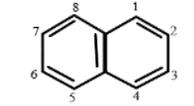
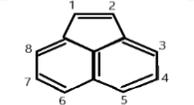
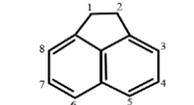
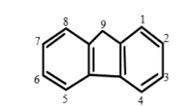
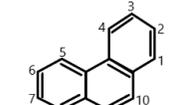
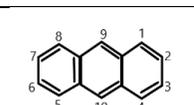
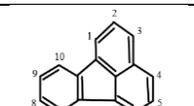
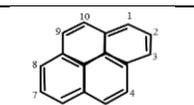
2.2.2.1. Hydrocarbures mono-aromatiques

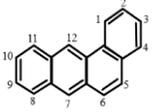
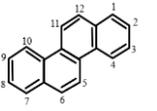
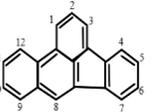
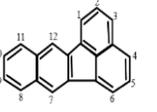
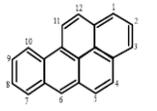
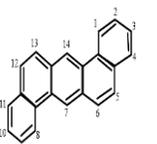
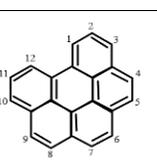
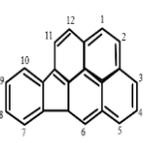
Les hydrocarbures mono-aromatiques appartiennent à la catégorie des composés aromatiques, qui se distinguent par la présence d'un unique anneau de benzène dans leur structure [99]. Ce sont des molécules omniprésentes dans l'environnement, notamment les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et les xylènes ortho, méta et para). On les trouve principalement dans l'essence et les carburants d'avion, ainsi que largement utilisés dans divers processus industriels [100]. Les BTEX sont des composés volatils, inflammables, cancérigènes et neurotoxiques, classés comme polluants prioritaires par l'Agence américaine de protection de l'environnement [101].

2.2.2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) résultent fréquemment de la combustion incomplète de matières organiques d'origine naturelle et anthropique (Fig. 3). L'industrie pétrochimique et le trafic urbain sont notamment reconnus comme les principaux responsables des émissions de HAPs [102–104]. En raison du transport atmosphérique à longue distance (LRAT), les HAPs peuvent en outre se disperser sur de longues distances, ce qui leur permet de migrer des zones sources vers des zones non sources. L'Agence américaine pour la protection de l'environnement (USEPA) a désigné les 16 composés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), à savoir le naphthalène (NAP), l'acénaphène (ACE), l'acénaphylène (ACY), le fluor (FLU), l'anthracène (ANT), le phénanthrène (PHE), le fluoranthène (FLUA), le benz[a] anthracène (BaA), le pyrène (PYR), chrysène (CHR), benzo[k]fluoranthène (BkF), benzo[b]fluoranthène (BbF), benzo[a]pyrène (BaP), benzo[ghi]pérylène (BghiP), dibenz[a,h]anthracène (DahA), et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène (IcdP), en tant que polluants hautement prioritaires en raison de leur potentiel d'exposition humaine, de leur toxicité et de leur présence fréquente dans les sites de déchets dangereux [105].

Tableau 1 : Majeures hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), leurs structures chimiques, et toxicité [105].

Composé	Structure	Abréviation	Nbr d'anneaux	Catégorie	IARC ^a	USEPA ^b	Potentiel carcinogène ^c	Liste de polluant ^d	TEF ^e
Naphtalène		NAP	2	LMW	2B	C	-	E	0.001
Acénaphthylène		ACY	3	LMW	3	Pas disponible	-	E	0.001
Acénaphtène		ACE	3	LMW	3	Pas disponible	-	E	0.001
Fluorène		FLU	3	LMW	3	D	-	E	0.001
Phénanthrène		PHE	3	LMW	3	D	-	E	0.001
Anthracène		ANT	3	LMW	3	D	-	E	0.01
Fluoranthène		FLUA	4	HMW	3	D	-	E, W	0.001
Pyrène		PYR	4	HMW	3	D	-	E	0.001

Benzo[a]anthracène		BaA	4	HMW	3	B2	+	E	0.1
Chrysène		CHR	4	HMW	2B	B2	±	E	0.01
Benzo[b]fluoranthène		BbF	5	HMW	2B	B2	++	E	0.1
Benzo[k]fluoranthène		BkF	5	HMW	2B	B2	-	E, W	0.1
Benzo[a]pyrène		BaP	5	HMW	1	B2	+++	E, W	1
Dibenzo[ah]anthracène		DahA	5	HMW	2A	Pas disponible	+++	E	5
Benzo[ghi]perylène		BghiP	6	HMW	2A	D	-	E, W	0.01
Indeno[123-cd]pyrène		IcdP	6	HMW	2B	B2	+	E, W	0.1

a -Groupe 1- Cancérogène pour l'homme; Groupe 2A- probablement cancérigène pour l'homme; Groupe 2B- possiblement cancérigène pour l'homme; Groupe 3- inclassable quant au caractère cancérogène chez l'homme; Groupe 4- probablement non

cancérogène pour les humains [106–108]; **b** -Groupe A- cancérogènes pour l'homme; Groupe B- cancérogènes probables pour l'homme (B1: basé sur des preuves limitées de cancérogénicité chez l'homme et des preuves suffisantes de cancérogénicité chez les animaux; B2: basé sur des preuves suffisantes de cancérogénicité chez les animaux); Groupe C- cancérogènes possibles pour l'homme; Groupe D- non classifiable quant à la cancérogénicité humaine; Groupe E- preuve de non-cancérogénicité pour l'homme [109] ; **c** - Académie nationale des sciences, (1972) – non cancérogène; ± incertain ou faiblement cancérogène; + cancérogène, ++ et + + + fortement cancérogène; **d** - HAPs sur la liste des polluants de l'Agence de protection de l'environnement (E) et de l'Organisation mondiale de la santé (W); **e** – Estimation du facteur d'équivalence toxique (TEF) basée sur la puissance relative par rapport au benzo[a]pyrene [110].

LMW- HAPs de faible poids moléculaire ; **HMW** – HAPs de haut poids moléculaire.

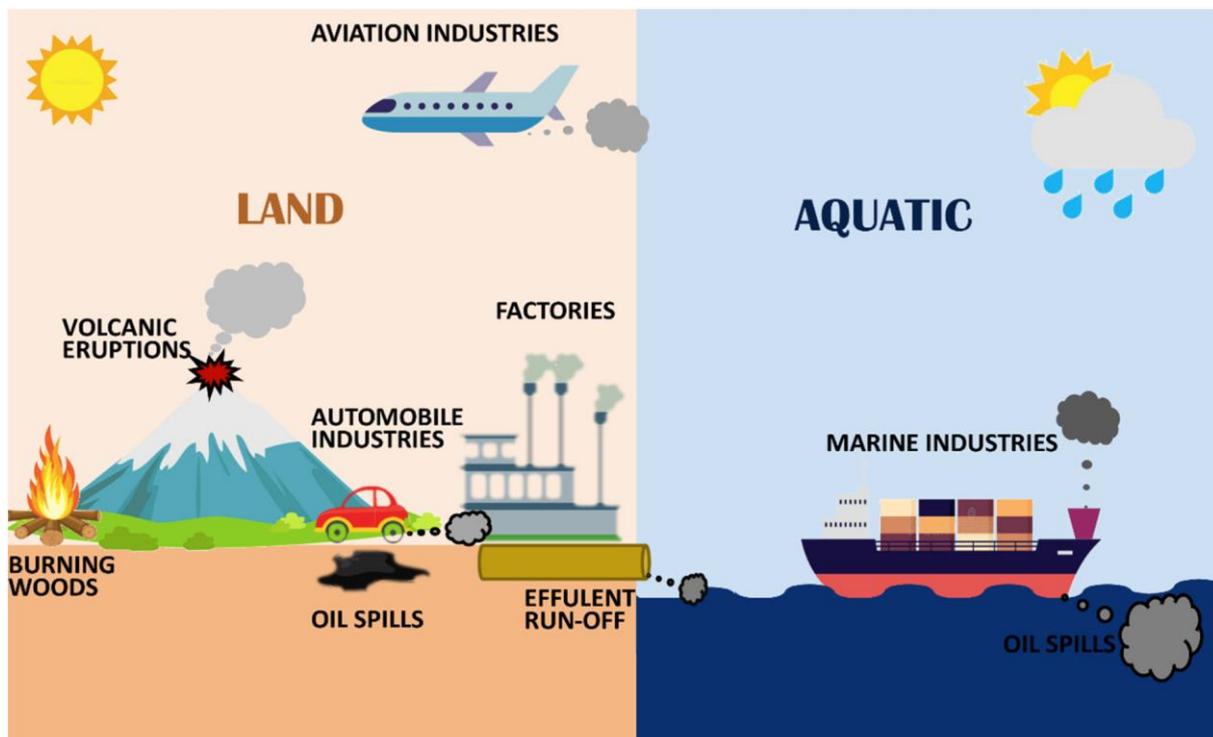


Figure 3 : Sources naturelles et anthropiques de HAP dans l'environnement [111].

2.2.2.2.1. Propriétés des HAPs

Les HAPs sont généralement incolores, blancs ou de couleur jaune pâle dans leur forme chimique pure et sont connus pour leur nature stable et réfractaire. La classification des HAPs se base sur le nombre d'anneaux de benzène aromatiques qu'ils contiennent [111]. Dans les milieux environnementaux, les HAPs se présentent sous forme de composés constitués de deux à sept anneaux conjugués, avec des masses molaires variant de 128 à 302 g mol⁻¹ [112]. Les HAPs de faible poids moléculaire (LMW) comprennent deux ou trois anneaux de benzène, avec des exemples tels que l'acénaphthène, l'anthracène, le naphtalène, le fluorène et le phénanthrène. D'autre part, les HAPs de poids moléculaire élevé (HMW), qui contiennent plus de trois anneaux de benzène, incluent des composés tels que le benzo(a)pyrène (B(a)P), le dibenz(a,h)anthracène, le pyrène et le chrysène [113,114]. Actuellement, l'analyse des HAPs est réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et à un détecteur de spectrométrie de masse (GC-FID/GC-MS), ainsi que de la

chromatographie liquide à haute performance couplée à un capteur ultraviolet-visible (HPLC-UV). L'application de méthodologies de plus en plus sophistiquées, telles que la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et le temps de vol quadripolaire (QTOF), peut fournir une caractérisation précise des HAPs [105].

2.2.2.2.2. Sources environnementales de HAPs

Les HAPs sont un groupe significatif de produits chimiques formés principalement par la combustion incomplète de matériaux organiques. Ils sont couramment associés à l'utilisation de pétrole, de gaz, de charbon et de bois pour la production d'énergie, ainsi qu'au tabagisme en intérieur et au chauffage, affectant la qualité de l'air [111].

L'atmosphère est le principal récepteur des HAPs, en faisant un moyen clé pour leur dispersion. Les HAPs dans l'atmosphère proviennent de sources naturelles comme les volcans et les incendies de forêt, et de sources anthropiques telles que les échappements de véhicules, les incendies agricoles et diverses activités industrielles. Les zones urbaines ont généralement des concentrations de HAPs plus élevées que les zones rurales. Dans l'atmosphère, les HAPs existent sous deux formes : vapeur et solide, adhérant souvent aux particules en suspension [111,115].

Les HAPs atmosphériques sont continuellement déposés sur la surface de la terre par des mécanismes de dépôt sec ou humide, provenant de diverses sources, y compris les routes à proximité. La mobilité des HAPs dans le sol est influencée par la taille des particules absorbantes et la taille des pores du sol, la plupart des HAPs du sol étant attachés aux particules du sol [116,117].

Les mêmes facteurs affectant le dépôt dans les sols de surface s'appliquent également aux environnements sédimentaires. Les HAPs peuvent se lier aux particules d'air au-dessus des plans d'eau dans les zones rurales et se déposer sur les surfaces sèches ou humides. Ils finissent par se mélanger avec les limons après avoir été dispersés par les courants [118]. Dans les zones urbaines, le dépôt aérien de HAPs affecte les sédiments, avec des apports supplémentaires provenant du ruissellement routier, des effluents d'eaux usées sanitaires et des drains d'orage. Certains HAPs finiront par se dissoudre dans les particules, se déposer et se

retrouver dans l'enregistrement sédimentaire, qui a été utilisé pour étudier l'entrée des HAPs dans l'environnement [118].

2.2.2.2.3. Toxicité des HAPs

Les HAPs sont classés parmi les substances les plus dangereuses pour la santé humaine et l'environnement en raison de leur potentiel cancérigène et mutagène [105]. De plus, leur forte lipophilie facilite l'absorption de ces substances dans les tissus corporels des mammifères, augmentant ainsi le risque d'effets néfastes sur la santé [119]. La gravité des effets cancérigènes et mutagènes d'un HAPs est associée à sa complexité structurale, les composés plus complexes étant généralement plus dangereux [119]. Diverses études épidémiologiques ont établi un lien entre l'exposition aux HAPs environnementaux et une augmentation du risque de cancer chez l'homme [120]. La santé humaine est particulièrement affectée par les HAPs, dont la toxicité varie en fonction de facteurs tels que le niveau et la durée d'exposition, ainsi que du composé HAPs spécifique. Les principales voies d'exposition aux HAPs chez les humains sont l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané. Des études ont établi un lien entre l'exposition environnementale aux HAPs et des problèmes de santé tels que des maladies de la peau, des troubles pulmonaires et divers types de cancer [121,122]. L'exposition aux HAPs a été démontrée comme provoquant du stress oxydatif chez les humains et les animaux [123]. Des études spécifiques ont mis en évidence l'impact de l'exposition aux HAPs sur la santé des enfants, les effets génotoxiques des HAPs dans les lixiviats de décharges et les sédiments de rivière, ainsi que les conséquences d'une augmentation des niveaux sanguins de certains HAPs sur les conditions respiratoires et le stress oxydatif chez les enfants [123]. Le naphtalène, un HAPs fréquemment étudié, est rapidement absorbé par les tissus du foie, des reins et des poumons, où il manifeste sa toxicité. Il peut provoquer des conditions telles que l'anémie hémolytique et agir comme un inhibiteur de la respiration mitochondriale [124]. De plus, de nombreux HAPs sont génotoxiques, causant des dommages cytogénétiques en s'intégrant dans l'ADN et en formant des adduits d'ADN [119]. En outre, ces composés nuisent aux plantes, réduisant la productivité agricole, et présentent des risques pour diverses espèces sauvages, y compris les poissons et les animaux marins, en provoquant des problèmes immunologiques, et de troubles cardiaques. Les HAPs s'accumulent

également dans les écosystèmes aquatiques et le sol, où ils peuvent nuire aux organismes aquatiques et aux microorganismes du sol [125].

2.3. Biodégradation des hydrocarbures

La dégradation des hydrocarbures est fortement influencée par les interactions des organismes vivants. La solubilité limitée des hydrocarbures dans l'eau entrave leur biodégradation, un processus effectué par des actinomycètes, des champignons et des bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme source d'énergie et de carbone. L'efficacité de ces microorganismes dépend de leur composition enzymatique et de leur capacité à traiter les hydrocarbures [126].

La dégradation microbienne des hydrocarbures en produits chimiques plus simples, moins dangereux ou non toxiques, fait l'objet de recherches depuis longtemps. Il convient de noter que les capacités bactériennes telles que l'adhésion cellulaire et l'hydrophobie de surface, la synthèse de biosurfactants, la motilité et les activités de chimiotaxie ont le potentiel de réduire la séparation spatiale entre les micro-organismes et les substrats solides, augmentant ainsi la biodisponibilité [95]. Il a été démontré que les molécules d'hydrocarbures, qui servent de sources de carbone et d'énergie pour de nombreuses espèces bactériennes, fonctionnent comme des chimio-attracteurs pour certains organismes. Bien qu'il existe un ensemble substantiel de connaissances sur les voies cataboliques impliquées dans la décomposition des hydrocarbures et des substances similaires [127].

2.3.1. Biodégradation des hydrocarbures poly-aromatiques

Il est communément admis que la bioremédiation, qui englobe les techniques de biostimulation et de bio augmentation, est une approche durable pour résoudre le problème de la contamination par les HAPs, et qu'elle offre des avantages significatifs[128]. La bioremédiation microbienne des HAPs se produit à la fois dans des conditions aérobies et anaérobies, avec une majorité de microbes dégradant les HAPs sous des conditions strictement aérobies, principalement parce que les microorganismes aérobies sont plus faciles à cultiver [8].

2.3.1.1. Biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie des HAPs implique l'activité des enzymes mono- et dioxygénase, suivie par le clivage des anneaux [8]. Elle consiste en la transformation des HAPs en intermédiaires en présence d'oxygène, implique diverses bactéries. Leurs voies métaboliques ont été proposées pour une variété de HAPs, qu'ils soient à faible ou à fort poids moléculaire [129]. Bien que le processus fondamental du catabolisme aérobie soit similaire pour toutes les bactéries dégradant les HAPs, les intermédiaires spécifiques et les produits finaux varient d'une souche bactérienne à l'autre. Dans la première étape de ce processus, une molécule de HAPs est oxydée pour former un dihydrodiol grâce à un système enzymatique multi-composants qui intègre de l'oxygène moléculaire dans le noyau du HAP [130]. Certaines études ont également évoqué l'implication de la dioxygénase ou de la dioxygénase d'hydroxylation de l'anneau aromatique (ARHD) dans l'apport d'oxygène à l'anneau benzénique des HAPs [8,124,131]. Les intermédiaires déshydratés qui résultent de cette oxydation peuvent ensuite emprunter soit des voies d'*ortho*-clivage, soit des voies de *méta*-clivage, pour finalement être convertis en intermédiaires du cycle tricarboxylique [132]. L'*ortho*-clivage consiste en la rupture de l'anneau aromatique entre les atomes de carbone portant des groupes hydroxylés, conduisant à la formation d'acides aromatiques dicarboxyliques [133]. En revanche, le *méta*-clivage intervient au niveau d'une autre liaison carbone-carbone, produisant des acides aromatiques monocarboxyliques et, dans certains cas, de l'acide 2-céto-3-butanoïque. Ce dernier est ensuite converti en pyruvate et en un dérivé de HAPs avec un anneau en moins [133]. Les bactéries dotées des activités enzymatiques appropriées clivent séquentiellement tous les anneaux de la molécule de HAP, aboutissant à la formation de composés centraux du métabolisme. Il convient de noter que les voies de dégradation de différents HAPs coïncident à certaines étapes, mais diffèrent principalement dans les réactions initiales [133]. Cependant, dans les environnements naturels, la présence d'oxygène est limitée en raison de sa consommation dans les processus de biodégradation aérobie. Cette diminution de l'oxygène entraîne une réduction des accepteurs d'électrons comme le sulfate, le fer ou le nitrate. Des substances telles que le peroxyde d'hydrogène, le nitrate de sodium et le perchlorate ont été principalement utilisées comme alternatives [8].

2.3.1.2. Biodégradation anaérobie

Dans des environnements tels que les sols et les sédiments contaminés par les HAPs, des conditions aérobies peuvent conduire au développement de zones anaérobies en raison de l'épuisement de l'oxygène moléculaire lors de la respiration aérobie [129]. Cet épuisement est provoqué par la stimulation de la communauté microbienne indigène, et l'oxygène n'est pas réapprovisionné au même rythme que sa diminution [134]. En conséquence, des zones anaérobies se forment dans le sol contaminé par les HAPs. Par conséquent, la remédiation anaérobie des HAPs devient plus cruciale, notamment dans les sites pollués par le pétrole [129]. Cependant, la biodégradation anaérobie ou anoxique des HAPs a fait l'objet de moins de recherches par rapport à la dégradation aérobie. La biodégradation anaérobie est généralement plus lente, et ses mécanismes biochimiques ne sont pas entièrement établis [134].

Néanmoins, la biodégradation anaérobie est considérée comme une technique de remédiation pratique et économique pour les sols et les sédiments contaminés par les HAPs. La dégradation anaérobie des HAPs, en particulier par les microorganismes indigènes, est particulièrement souhaitable pour la remédiation des sédiments pollués par les HAPs [135]. Certaines études ont montré que des HAPs de faible poids moléculaire (LMW), tels que le naphthalène et le phénanthrène, peuvent être biodégradés dans des conditions anaérobies, telles que les conditions dénitrifiantes [136]. En revanche, les HAPs de poids moléculaire élevé (HMW) ont tendance à être plus facilement biodégradés dans des conditions de réduction des sulfates, qui sont anaérobies [137]. De manière intéressante, sous des conditions de dénitrification, le taux de biodégradation anaérobie des HAPs est presque équivalent à celui sous conditions aérobies, contrastant avec les conditions normales où la dégradation aérobie dépasse la dégradation anaérobie [8]. Diverses études ont démontré que certains HAPs, notamment le phénanthrène, le naphthalène, l'acénaphthène et le fluoranthène, peuvent être biodégradés en l'absence d'oxygène dans le cadre d'études en microcosme en utilisant du nitrate, du fer ferrique, du sulfate comme accepteurs d'électrons, et même dans des conditions méthanogènes [138].

Les bactéries réductrices de sulfate et nitrate jouent un rôle dans la biodégradation des HAPs sous conditions anaérobies [8]. Bien que, certaines recherches aient examiné les voies métaboliques de la dégradation des HAPs dans des conditions méthanogènes. Il a été observé que les HAPs peuvent être dissipés dans des conditions de réduction des nitrates et des sulfates [134], la fermentation et la respiration étant toutes deux essentielles à une dégradation efficace des HAPs. La dégradation anaérobie des HAPs, tels que le fluorène, le phénanthrène et le pyrène, dans des conditions dénitrifiantes est possible grâce à la fermentation et à la respiration des bactéries en présence de co-métabolites de faible poids moléculaire et d'accepteurs d'électrons appropriés, tels que le nitrate [139]. En général, les bactéries anaérobies initient la biodégradation des HAPs en introduisant les deux atomes d'oxygène dans le noyau aromatique des HAPs, une réaction catalysée par une dioxygénase multicomposante composée d'une réductase, d'une ferredoxine et d'une protéine à fer-soufre [129]. Les microorganismes anaérobies capables de dégrader les HAPs sont relativement rares, et des voies réductrices sont globalement engagées dans la dégradation des HAPs dans des environnements anaérobies [8].

2.3.1.3. Biodégradation des *n*-alcanes

Divers microorganismes capables de décomposer les alcanes ont été identifiés, comme *Rhodococcus* sp [140], *Fusarium* sp [141], *Staphylococcus* sp [28], *Pseudomonas* sp [9,142] *Rhodotorula* sp [143], *Candida* sp [144], comme des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures et de produire des bio-émulsifiants lorsqu'elle utilise des *n*-alcanes comme seule source de carbone. Les bactéries peuvent absorber et transporter les alcanes solubles dans la phase liquide, car elles ne peuvent utiliser que les hydrocarbures solubilisés [145]. Le processus de biodégradation aliphatique diffère de celui des composés aromatiques, toute l'idée c'est que la dégradation de ces substances repose sur des microbes qui prospèrent dans des environnements contaminés par le pétrole et jouent un rôle crucial dans le traitement de tels polluants [146]. Un défi clé dans ce processus, surtout à basse température, est la disponibilité limitée des différentes fractions du pétrole [145]. Les substances tensio-actives telle que les biosurfactants, peuvent augmenter la surface des substrats hydrophobes, améliorant ainsi leur biodisponibilité, ce qui à son tour stimule la croissance bactérienne et l'efficacité de la bioremédiation [145]. Les *n*-alcanes C₁₀–C₁₃ sont généralement métabolisés en premier, indiquant un

nombre de carbones optimal pour la dégradation, car l'enthalpie de réaction augmente et la solubilité dans l'eau diminue avec des chaînes d'alcanes plus longues. Les hydrocarbures aromatiques ont tendance à être plus résistants à la biodégradation que les aliphatiques, avec les alcanes à chaîne ramifiée et cycliques montrant également une résistance plus élevée par rapport à leurs homologues linéaires [126].

2.3.2. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

La bioremédiation des hydrocarbures, y compris les HAPs, est un processus complexe influencé par une multitude de facteurs interdépendants. Ces facteurs peuvent être classés en quatre grandes catégories : les caractéristiques des contaminants, les propriétés du milieu contaminé, les conditions environnementales, et les dynamiques écologiques des micro-organismes impliqués [126,147,148]. La structure moléculaire des HAPs, leur solubilité, et leur concentration affectent directement leur biodégradabilité. Les propriétés physico-chimiques telles que la structure et la capacité de transport cellulaire des HAPs déterminent leur accessibilité aux micro-organismes dégradants [148,149]. Aussi, La nature du matériel contaminé, y compris la présence de barrières chimiques dans les milieux de croissance, et l'existence de sources de carbone supplémentaires, jouent un rôle crucial dans la facilitation ou l'entrave du processus de bioremédiation [148,149]. Les conditions abiotiques telles que le pH, la température, l'oxygénation, la salinité, et la disponibilité en nutriments et en eau influencent considérablement l'efficacité de la biodégradation. Ces facteurs conditionnent non seulement la survie et la croissance microbienne mais aussi leur capacité métabolique à dégrader les HAPs [126,148,149]. De plus, la diversité, l'adaptabilité et la préférence des communautés microbiennes, ainsi que leur exposition préalable aux toxines et leur interaction avec les biosurfactants, sont déterminantes pour la réussite de la bioremédiation. La capacité des micro-organismes natifs à se développer et à métaboliser les polluants est essentielle [148,149]. L'efficacité de la bioremédiation des HAPs repose sur une combinaison optimale de ces facteurs. La compréhension approfondie de ces éléments et leur gestion adéquate sont cruciales pour améliorer les processus de biodégradation et réaliser une bioremédiation efficace des sites contaminés par des HAPs [111,126,148].

2.3.2.1. Oxygène

L'efficacité de la bioremédiation des HAPs dépend de multiples facteurs environnementaux et microbiologiques, mais l'apport en oxygène se révèle être un élément déterminant pour activer le mécanisme de dégradation et optimiser le processus de remédiation. Bien que la dégradation des HAPs puisse se produire dans des conditions à la fois aérobies et anaérobies, la majorité des recherches se sont concentrées sur les conditions aérobies [150,151], où l'oxygène joue un rôle crucial dans l'oxydation initiale des anneaux aromatiques par l'activité des enzymes monooxygénase et dioxygénase [152]. Cette oxydation est facilitée par la fourniture d'oxygène depuis une source externe, soit par ajout manuel, soit par des méthodes chimiques, comme l'utilisation de molécules libérant de l'oxygène (par exemple, le peroxyde de magnésium) ou l'introduction de composés tels que le nitrate de sodium [152–154]. Des interventions spécifiques, telles que l'ajout d'eau bien oxygénée ou l'utilisation de composés libérant de l'oxygène, ont été démontrées pour augmenter la capacité de dégradation des HAPs, rendant la remédiation plus efficace [111]. Ces techniques visent à améliorer la biodégradation intrinsèque des HAPs dans les milieux contaminés, comme les aquifères ou les sédiments, en amplifiant les conditions favorables au métabolisme microbien [153]. En somme, l'efficacité de la bioremédiation des HAPs dépend largement de la gestion et de la modulation des conditions environnementales, en particulier de la disponibilité de l'oxygène, qui est essentiel à l'activation des processus enzymatiques nécessaires à la dégradation des polluants. La compréhension et l'application de ces principes permettent de développer des stratégies de remédiation plus ciblées et efficaces pour la dépollution des sites contaminés par les HAPs.

2.3.2.2. pH

La bioremédiation des HAPs est significativement influencée par le pH du milieu, un facteur crucial pour une dégradation efficace de ces contaminants [151,155]. Les micro-organismes, en particulier les bactéries, qui sont au cœur de ce processus, préfèrent des conditions proches de la neutralité, idéalement entre 6,5 et 7,5, pour leurs activités physiologiques normales [151,156]. Toutefois, la réalité des sites contaminés par les HAPs montre souvent un écart par rapport à cette plage idéale de pH, avec des sols pouvant devenir soit trop acides soit trop alcalins, en

raison de phénomènes tels que la lixiviation de ciments de béton, de briques, ou de déversements de charbon, modifiant ainsi le pH naturel du sol [157–159].

Ces variations de pH entraînent des impacts significatifs sur l'activité microbienne, pouvant inhiber la biodégradation des HAPs [158,160]. Dans les sols alcalins, par exemple, cela peut être dû à la lixiviation de matériaux de construction, tandis que dans les sols acides, cela peut résulter de l'oxydation des sulfures issus de déversements de charbon [158,160]. Ces conditions extrêmes nécessitent une intervention pour ajuster le pH à un niveau plus favorable à la bioremédiation, utilisant des agents comme le carbonate de calcium pour acidifier ou le sulfate d'ammonium/nitrate d'ammonium pour alcaliniser le sol [161,162]. De plus, les études indiquent que la salinité du sol influence également la dégradation des HAPs, avec une forte salinité inhibant considérablement la biodégradation, tandis qu'une salinité modérée pourrait légèrement améliorer le taux de dégradation. Ces découvertes soulignent l'importance d'ajuster non seulement le pH mais aussi d'autres paramètres environnementaux pour optimiser la bioremédiation des HAPs dans les environnements contaminés [163].

2.3.2.3. Nutriments

La biodégradation des HAPs est fortement influencée par la disponibilité des nutriments, qui joue un rôle déterminant dans le succès du processus de bioremédiation [151,164]. Les micro-organismes responsables de la dégradation des HAPs nécessitent un apport en nutriments essentiels, tels que l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), et le fer, ainsi qu'une source de carbone et d'énergie facilement assimilable pour soutenir leurs fonctions métaboliques [151,165]. L'enrichissement en nutriments des sites contaminés est donc crucial pour stimuler la croissance des microorganismes autochtones et accélérer la dégradation des polluants [165]. Dans des contextes spécifiques, comme les environnements salins, la carence en azote et en phosphore peut entraver la bioremédiation des hydrocarbures, mettant en évidence l'importance d'ajuster l'apport en nutriments selon les conditions environnementales [159,166]. Cependant, il est essentiel de moduler cet apport car un excès en nutriments peut aussi être contre-productif. Des niveaux de nutriments supérieurs aux seuils optimaux peuvent nuire à la biodégradation des HAPs, en ralentissant la décomposition des polluants organiques

et, par conséquent, le processus de bioremédiation dans son ensemble [159,167]. Ainsi, une gestion équilibrée de la nutrition des microorganismes s'avère être une stratégie clé dans la bioremédiation des sites contaminés par les HAPs, nécessitant une approche nuancée qui prend en compte à la fois les besoins des microorganismes et les caractéristiques spécifiques de l'environnement contaminé pour optimiser l'efficacité du processus de dépollution [111,159].

2.3.2.4. Température

La température environnementale joue un rôle prépondérant dans la dégradation des HAPs, influençant directement la capacité des micro-organismes à procéder à la bioremédiation [157]. La solubilité et, par conséquent, les taux d'absorption des HAPs augmentent avec la température, favorisant ainsi leur dégradation [168]. Toutefois, cette efficacité varie selon le type de bactéries ; les bactéries mésophiles aérobies voient leur activité diminuer à des températures élevées à cause de la réduction du taux d'oxygène dissous, tandis que les psychrophiles préfèrent les températures plus fraîches et les thermophiles les températures plus élevées [168]. Les recherches indiquent que la plage de température mésophile de 20 °C à 45 °C est idéale pour la biodégradation des HAPs [169]. Cependant, la dégradation a également été observée dans des conditions extrêmes, telles que des températures aussi basses que 0 °C dans des eaux salées contaminées par du pétrole brut [170], ainsi qu'à des températures supérieures à 50 °C, où plus de 90% des HAPs dans le compost de champignons ont été dégradés par des enzymes ligninolytiques [171]. Une élévation de la température peut également entraîner la transformation des HAPs en nouveaux composés, souvent plus toxiques, ce qui peut compliquer et ralentir le processus de bioremédiation [147]. Malgré cela, des études récentes explorant la bioremédiation des HAPs à des températures très élevées ont élargi notre compréhension de la dégradation microbienne, même si la plupart des recherches antérieures se sont concentrées sur la décomposition anaérobie à des températures modérées [111,172]. La température influence de manière significative le processus de biodégradation des HAPs, avec des implications complexes pour la bioremédiation. Les efforts pour nettoyer les sites contaminés doivent donc prendre en compte le spectre complet des réponses microbiennes aux variations thermiques pour optimiser la dégradation des polluants [111,172].

2.3.2.5. Biodisponibilité des hydrocarbures

Dans un écosystème naturel, la biodisponibilité désigne la capacité des organismes vivants à absorber ou modifier une substance, ce qui dépend de facteurs tels que les processus biologiques, la solubilité, et les interactions avec le sol et les composés organiques [173,174]. Cette biodisponibilité est essentielle pour la remédiation des polluants, mais la faible solubilité des HAPs, leur adhérence au sol et leur complexité moléculaire réduisent leur disponibilité [175,176]. Il a également été observé que plus les HAPs ont un poids moléculaire élevé, moins leur solubilité dans l'eau est importante, ce qui entraîne une biodisponibilité réduite [160,177]. De plus, avec le temps, les HAPs peuvent subir un vieillissement de la contamination, devenant moins accessibles aux méthodes d'extraction chimique et biologique, ce qui limite leur biodisponibilité dans les efforts de remédiation environnementale [160,177].

2.3.2.6. Concentration de HAPs et toxicité des produits finaux

La bioremédiation, qui implique la décomposition de polluants toxiques dans l'environnement à l'aide de ressources biologiques, est un processus important. Cependant, il est essentiel de reconnaître que des concentrations élevées d'hydrocarbures peuvent affecter les activités des microorganismes [178]. Certaines études ont montré qu'une faible concentration de pétrole brut dans le sol favorisait la dégradation des hydrocarbures, tandis qu'une concentration plus élevée pouvait réduire la biodégradation en raison de limitations en nutriments [126]. Encore, le produit final de la dégradation des polluants et sa toxicité ne sont pas toujours bien compris [152,179]. Il est donc déterminant de bien identifier et détoxifier les produits finaux des impuretés à la fin de chaque étude [152,179]. Par exemple, certaines études ont montré que la dégradation des HAPs peut produire des contaminants oxy-HAPs plus nocifs que les HAPs d'origine [160,180]. Donc, la surveillance attentive des métabolites produits pendant la bioremédiation est essentielle pour évaluer leur toxicité avant et après le traitement, car les hydrocarbures oxydés peuvent être plus dangereux que les HAPs initiaux [111,159]. De plus, la présence de mélanges de HAPs dans l'environnement peut influencer leur dégradation par les microorganismes où des études ont montré que les populations bactériennes ciblent initialement les HAPs de poids moléculaire élevé, puis ceux de

poids moléculaire plus faible [181]. De plus, lorsque la concentration d'un HAPs spécifique, comme le phénylène, est élevée, elle peut entraver la dégradation des autres HAPs par la population bactérienne. Dans les mélanges binaires utilisant deux colonies bactériennes pures, le phénol, le méthylnaphtalène et le pyrène ont été observés comme des obstacles compétitifs à la dégradation du pyrène [182]. Par conséquent, la concentration de HAPs dans l'environnement peut augmenter pendant la biodégradation sur site, il est donc important de surveiller les interactions entre les substrats pour éviter une augmentation de la concentration de HAPs lors de la biodégradation sur site [182]. En fin de compte, la détoxification et la surveillance des produits finaux sont essentielles pour garantir l'efficacité et la sécurité de la bioremédiation des polluants [172].

3. Bioremédiation

3.1. Introduction

En raison de la répartition de plusieurs polluants, il devient essentiel de mettre au point une technologie de restauration pour nettoyer les sites contaminés [183]. Outre, les nombreuses techniques actuellement utilisées pour dépolluer des sites pollués, y compris les procédures chimiques et physiques qui nécessitent l'utilisation de ressources énergétiques substantielles et peuvent entraîner la production de polluants secondaires [184–186], la bioremédiation s'est imposée comme une approche viable et respectueuse de l'environnement pour l'élimination des toxines de l'écosystème environnant [187]. La bioremédiation, également connue sous le nom de biotraitement, et la bioremédiation [188], a été identifiée comme une technique utilisant des plantes et des bactéries ou des champignons pour la dégradation ou la détoxification de matériaux dangereux provenant de la zone polluée [189,190]. En comparant les approches physico-chimiques à la bioremédiation, il a été démontré que la bioremédiation est une approche respectueuse de l'environnement, économique et durable pour traiter efficacement les contaminants [191,192]. L'objectif principal de la bioremédiation est de parvenir à la décomposition complète des polluants en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau grâce à l'utilisation de micro-organismes vivants, tout en évitant la production d'autres polluants [193,194]. Le domaine de la bioremédiation implique de nombreux processus tels que la biotransformation, la bioaccumulation, la biosorption et la stabilisation biologique, qui utilisent des micro-organismes, des plantes, des enzymes ou leurs combinaisons [195]. En effet, il convient d'ajouter qu'une série de stratégies récentes de bioremédiation, y compris l'utilisation d'émulsifiants, de biosurfactants, de biopesticides, d'enzymes et d'organismes génétiquement modifiés (OGM), peuvent potentiellement être utilisées [196]. La remédiation microbienne est une stratégie efficace pour éliminer les polluants des sites contaminés [57]. Ces polluants sont utilisés par les micro-organismes comme source de carbone et d'énergie [134,197,198]. Par conséquent, la bioremédiation peut être intrinsèque lorsqu'elle se produit d'elle-même, ou peut-être bio-stimulée uniquement lorsqu'elle se produit par l'ajout d'oxygène, d'engrais, etc. Cela favorisera la croissance des micro-organismes dégradant les polluants à l'intérieur du milieu [189]. Lorsque les contaminants sont traités sur le site, la bioremédiation peut

être classée comme *in-situ*, et *ex-situ* lorsque les contaminants sont prélevés et traités ailleurs [199]. L'utilisation de consortiums bactériens, par opposition aux souches pures, est une approche plus efficace pour parvenir à un traitement biologique durable des contaminants. Cela est dû aux capacités métaboliques de soutien dont font preuve les consortiums bactériens [194].

3.2. Biostimulation

La biostimulation consiste à renforcer la capacité de dégradation des communautés microbiennes indigènes par l'application de préparations nutritives optimisées, de matériaux de support et d'amendements. Cette opération vise à augmenter les processus métaboliques des micro-organismes qui peuvent utiliser les polluants présents dans le sol comme sources d'énergie [200,201]. Dans les traitements de biostimulation, une étude récente a rapporté l'efficacité élevée de l'élimination des hydrocarbures pétroliers et des métaux lourds à l'aide d'un apport organique.

3.3. Bio augmentation

Cette approche fondamentale comprend l'introduction dans le sol de microbes exogènes ayant des capacités de dégradation [200,202]. L'efficacité de la remédiation est renforcée par la mise en œuvre de la bio augmentation, qui implique l'introduction délibérée de bio-agents, tels que des bactéries pures capables de décomposer les contaminants, ainsi qu'un consortium microbien, dans le sol pollué [60,203]. L'utilisation d'un consortium microbien peut améliorer la décomposition des polluants grâce à l'action collective de plusieurs micro-organismes, améliorant ainsi la résistance aux facteurs externes. Cependant, l'obtention de conditions stables pour l'induction du consortium microbien constitue un défi [204]. En plus, la culture en masse de chaque micro-organisme individuel au sein du consortium est difficile en raison des variations de leurs conditions de culture optimales [204,205]. Pour résoudre ce problème, on peut envisager d'utiliser une bactérie pure au lieu d'un consortium microbien [206]. Certainement, l'approche de la bio augmentation permet aussi de découvrir des micro-organismes qui possèdent la capacité de dégrader ou de convertir des substances dangereuses en des formes moins toxiques [207,208]. Sur la base de la littérature existante, il a été observé que la majorité des champignons présentent une nature résistante et possèdent un degré plus élevé de

tolérance aux concentrations élevées de contaminants par rapport aux bactéries. Cette observation est corroborée par les caractéristiques morphologiques et biologiques complexes et avancées inhérentes aux champignons, comme l'indiquent des études antérieures [209].

3.4. Nano-bioremediation

La nano bioremediation (NBR) est la méthode qui consiste à appliquer des nanoparticules/nanomatériaux produits par des plantes, des champignons et des bactéries pour éliminer les contaminants de l'environnement (tels que les polluants organiques et inorganiques) dans les zones polluées à l'aide de la nanotechnologie [187,210,211]. La nano bioremediation a attiré l'attention de la communauté scientifique au cours des dernières années en raison de la combinaison particulière de nanomatériaux et de techniques de bioremediation [187]. La mise en œuvre de cette approche peut améliorer l'efficacité, le rendement temporel et la durabilité écologique du processus de remédiation, augmentant ainsi les avantages qui y sont associés [212,213]. D'après Kaur et *al* [214], l'utilisation de nanoparticules (NPs) peut améliorer la dépollution en raison de leur rapport surface/masse élevé, qui permet l'introduction d'une plus grande quantité de particules dans l'environnement. La NBR a pour objectif de réduire les effets secondaires sur l'environnement et de diminuer les niveaux de contaminants [215].

3.5. Phytoremediation

La phytoremediation est une méthode de bioremediation reconnue pour sa fiabilité et son approche écologique. Le processus utilise donc les plantes pour absorber, stabiliser et convertir divers contaminants présents dans le sol ou l'eau [216]. Si les plantes absorbent généralement les polluants présents dans le sol, leur capacité à absorber le pétrole ou ses dérivés est limitée en raison de leur insolubilité dans l'eau [217]. Le niveau de remédiation des polluants par les plantes varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la variété spécifique de plantes [218], la biomasse végétale [219,220], le type de sol [221,222], et les conditions environnementales [223–225].

De nombreuses plantes forment des interactions symbiotiques avec diverses espèces bactériennes résidant à proximité de leurs racines, ce qui a permis

d'améliorer le taux de biodégradation des composés organiques. Les plantes et les micro-organismes sont connus pour jouer un rôle important dans la remédiation de l'environnement, accélérant ainsi le processus de nettoyage des déchets pétroliers [217]. Ainsi, les plantes aquatiques jouent un rôle essentiel dans le processus de phytoremédiation en accumulant et en dégradant efficacement les substances toxiques et en servant de surfaces d'adsorption des polluants [226].

La phytoremédiation comprend plusieurs méthodes (Fig. 4), à savoir la phyto extraction, la phyto stabilisation, la phyto volatilisation, la phyto transformation et la rhizofiltration :

- Phyto extraction : il s'agit du processus d'extraction et d'accumulation des polluants dans les pousses de plantes, tout en minimisant les effets négatifs sur les qualités du sol [227]. L'extraction des polluants de l'environnement pollué pourrait être facilitée par le processus de récolte des plantes [228]. Les plantes absorbent les contaminants et les transportent ensuite vers divers organes de la plante, y compris les tiges, les racines et d'autres parties consommables [229].
- Phyto stabilisation : il s'agit d'une technique de remédiation dans laquelle les contaminants sont efficacement immobilisés à l'intérieur du système racinaire des plantes [230]. La phyto stabilisation peut transformer les polluants d'un état nocif en un état non toxique ou faiblement toxique [231]. En effet, la sécrétion de composés organiques par les racines des plantes a permis de stabiliser et d'immobiliser les composants nocifs, empêchant ainsi la dispersion des contaminants dans la rhizosphère de la plante [232]. L'absorption et la fixation des polluants sur les composants de la rhizosphère des plantes entraînent une réduction de la biodisponibilité de ces éléments [233].
- Phyto volatilisation : il s'agit d'une technique couramment employée pour la conversion et le rejet ultérieur d'éléments faiblement toxiques dans l'atmosphère par le phénomène de volatilisation [234]. Le processus de phyto volatilisation implique l'absorption des polluants par le système racinaire, leur translocation ultérieure vers le système racinaire et, enfin, leur libération dans l'atmosphère par diffusion. Les feuilles stomatiques libèrent dans l'atmosphère des polluants moins nocifs et moins volatils [235].

- Phyto dégradation : il s'agit des processus métaboliques qui se produisent dans les tissus végétaux et qui facilitent la décomposition et la transformation des contaminants. Les plantes ont la capacité de synthétiser des enzymes telles que l'oxygénase et la déhalogénase. Ces enzymes facilitent le processus catalytique de dégradation [5].
- Rhizofiltration : les plantes utilisées pour la rhizofiltration doivent avoir la capacité d'extraire une quantité adéquate d'eau du sol afin de faciliter la précipitation des contaminants à la surface des racines [236]. En parallèle, il convient de noter que les racines des plantes de la rhizosphère sont capables d'absorber les polluants présents dans le milieu environnant. De plus, ces polluants absorbés se fixent à l'intérieur des racines, ce qui entraîne leur transformation en une forme insoluble [237].

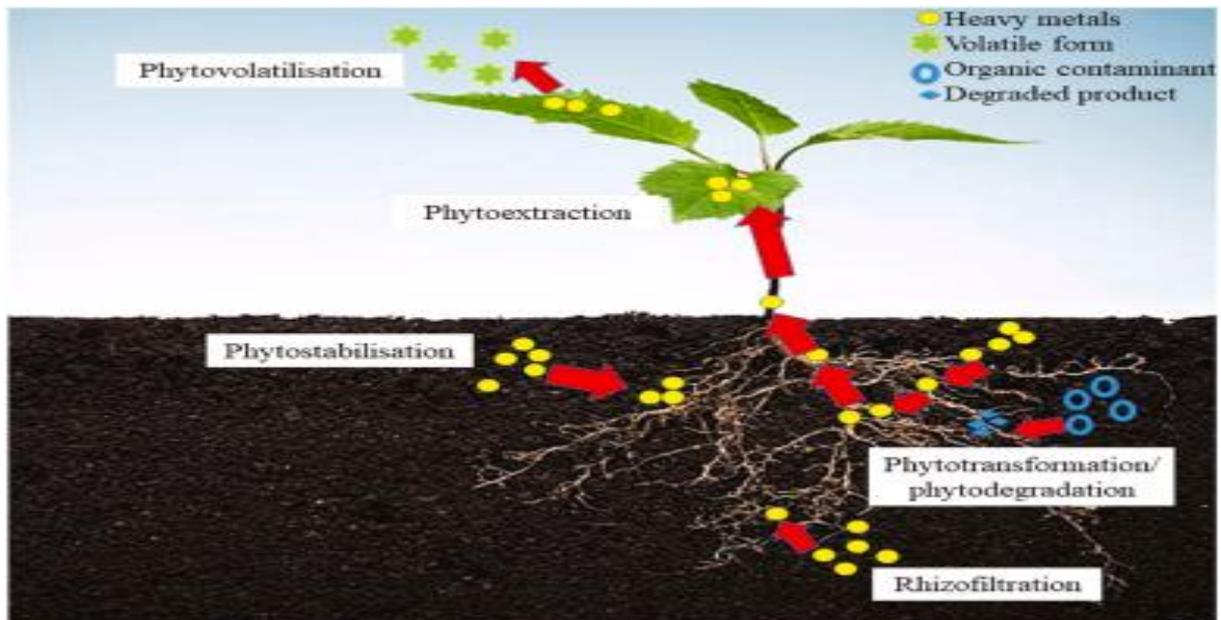


Figure 4 : Les plantes utilisent divers mécanismes pour remédier aux PTE dans le sol [216].

3.6. Applications des micro-organismes en bioremédiation

De nombreux micro-organismes sont isolés de l'environnement pollué et peuvent tolérer les contaminants [189]. La capacité métabolique des micro-organismes à convertir, dégrader ou accumuler les polluants tels que les hydrocarbures, les métaux lourds, les médicaments, les composés hétérocycliques et les radionucléides est essentielle pour garantir leur utilisation adéquate dans des niveaux optimaux de nutriments et d'autres produits chimiques essentiels [238].

En outre, tout micro-organisme qui sera utilisé dans les procédures de bioremédiation doit avoir un génotype résistant aux polluants. Les micro-organismes, quant à eux, possèdent des propriétés particulières qui les rendent plus acceptables pour la dépollution de l'environnement. En également, plusieurs études ont prouvé que les caractéristiques physiologiques des micro-organismes, telles que la synthèse de biosurfactants, la chimiotaxie et la formation de biofilms, jouent un rôle clé dans l'amélioration de la biodégradation [239,240].

3.6.1. Remobilisation des métaux lourds

Les métaux lourds ne peuvent pas être biodégradés et peuvent donc affecter les humains, les animaux et les plantes. Ils ont un impact direct sur l'activité métabolique des plantes, affectant la santé des personnes et réduisant la production alimentaire [241]. Par ailleurs, la contamination par les métaux lourds est principalement due aux engrais et aux pesticides, les engrais phosphatés représentant la source la plus courante de pollution des sols [242,243].

En prélevant les métaux lourds dans le sol, les plantes produisent des exsudats qui chélatent les ions métalliques et facilitent leur extraction et leur solubilité [242]. De nombreux micro-organismes ont également été signalés comme capables d'éliminer les métaux lourds tels que le cadmium, le zinc, le cuivre et le plomb des environnements pollués *via* de la bio sorption ou de la bio transformation [244]. Par exemple, plusieurs rapports scientifiques ont évalué la faisabilité de l'utilisation de *Rhizopseudomonas* favorisant la croissance des plantes pour éliminer les métaux lourds des sols et sédiments pollués [245].

3.6.2. Biodégradation des produits pétroliers

La plupart des pays industrialisés utilisent le pétrole comme principale source d'énergie, mais différentes activités d'exploration pétrolière, de transport et de vidange/fuite accidentelle de pétrole entraînent le rejet de quantités massives d'hydrocarbures usagés dans l'environnement, ce qui provoque une pollution importante [246]. Heureusement, les micro-organismes dégradant le pétrole peuvent également dégrader ces polluants organiques dans l'environnement, où ils utilisent ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie.

Parmi les bactéries qui dégradent le pétrole les plus étudiées, on peut citer *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Marinococcus*, et *Planococcus* [247].

3.6.3. Remobilisation des hydrocarbures poly aromatiques (HAPs)

Les hydrocarbures poly aromatiques sont des composés chimiques constitués principalement d'anneaux benzéniques ou penta cycliques fusionnés, organisés selon diverses conformations structurales [134]. En raison de leurs propriétés mutagènes et cancérigènes potentielles, ils font l'objet d'une attention particulière [248]. Ainsi, *via* de la chaîne alimentaire, ces composants peuvent être introduits dans les populations humaines et même chez les animaux [249].

Les micro-organismes sont essentiels à la décomposition des hydrocarbures poly aromatiques dans le sol [250], Il existe donc deux types principaux de biodégradation des hydrocarbures poly aromatiques : le métabolisme aérobie et le métabolisme anaérobie. L'oxydation du cycle aromatique est suivie par la décomposition systématique de la molécule en métabolites d'hydrocarbures poly aromatiques et en dioxyde de carbone dans les processus aérobies. Le métabolisme anaérobie des hydrocarbures poly aromatiques, quant à lui, est supposé se produire par l'hydrogénation du cycle aromatique de l'hydrocarbure [251].

Une autre façon d'améliorer la biodégradation des hydrocarbures poly aromatiques consiste à produire des biosurfactants qui peuvent améliorer la solubilisation apparente des hydrocarbures poly aromatiques, ce qui facilite leur biodégradabilité et leur mobilité [63,252–254]. En effet, l'application de la coculture fongique-bactérienne et des consortiums plantes-microbes peut être encouragée, et des recherches supplémentaires sont encore nécessaires à cet égard [129].

3.6.4. Dégradation du plastique

Les matières plastiques sont souvent des matériaux organiques synthétiques ou semi-synthétiques à haut poids moléculaire, constitués de longues chaînes de polymères [255]. Dans tous les secteurs de la vie et de la technologie, l'utilisation des matières plastiques augmente chaque année. Le polystyrène, le polyéthylène, le chlorure de polyvinyle, le polypropylène et le polyéthylène téréphtalate sont les polymères les plus couramment utilisés [256,257]. Malheureusement, environ 9 %

des déchets plastiques ont été recyclés, tandis que les 12% restants ont été brûlés. Les 79% restants sont stockés dans des décharges ou rejetés directement dans l'environnement [258]. La plupart des déchets plastiques pénètrent dans l'eau et sont ingérés par les animaux marins, dont ils perturbent l'habitat [256].

Il a été prouvé que de nombreux micro-organismes décomposent le plastique, notamment *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, et *Staphylococcus* [259]. Les plastiques sont dégradés en fonction de divers aspects, notamment la mobilité, le poids moléculaire, la cristallinité, les groupes fonctionnels ou les additifs additionnels aux polymères. La biodégradation du plastique se produit par la colonisation de la surface du plastique par des micro-organismes, ce qui entraîne une réduction du poids moléculaire du plastique. Le polymère est d'abord transformé en ses monomères qui se décomposent par minéralisation en dioxyde de carbone, en eau et en méthane [255,260].

Certains polymères plastiques sont trop gros pour être empêchés de traverser la membrane cellulaire ; ils sont donc d'abord dépolymérisés en monomères plus petits, puis absorbés par les micro-organismes. En outre, la biodégradation des plastiques est principalement basée sur la sécrétion d'enzymes telles que la protéinase k, la lipase et la déshydrogénase qui peuvent dégrader le polymère en une molécule plus petite, par exemple des oligomères, des dimères et des monomères [257].

3.6.5. Biodégradation des pesticides

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées pour prévenir et contrôler divers organismes nuisibles, notamment les bactéries, les virus, les champignons, les insectes, les nématodes, les mauvaises herbes, la flore et la faune indésirables [261]. Cependant, la pollution par les pesticides est devenue l'une des préoccupations majeures des scientifiques et des écologistes. Les pesticides peuvent s'accumuler dans les plantes, le sol et les organismes. Ces polluants peuvent se répandre dans l'eau, les aliments et le sol [5].

4. Biosurfactants

4.1. Introduction

L'implication des bactéries est très répandue dans les habitats qui ont été contaminés, et ces bactéries ont la capacité d'adopter de multiples comportements afin d'exploiter les contaminants [217]. Certaines bactéries indigènes ont la capacité de synthétiser des métabolites secondaires, notamment le sidérophore, l'acide indole acétique (IAA), la solubilisation du phosphate, et la libération de biosurfactant [262,263]. Par exemple, l'utilisation de souches de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, et *Candida* est connue comme un moyen de remédier aux composés organiques et inorganiques des environnements pollués par la production de biosurfactants [264–266].

Les biosurfactants sont une classe de biopolymères amphiphiles dotés de propriétés tensioactives et synthétisés par divers micro-organismes. Ces biopolymères sont constitués de composants hydrophobes et hydrophiles et jouent un rôle primordial dans la réduction des tensions superficielles et interfaciales (Fig. 5). La structure de ces biomolécules facilite en outre les processus d'émulsification et de mouillage, de moussage, d'étalement et de solubilisation de composites non miscibles [267,268]. Ces biotech-molécules reçoivent plus d'attention que leurs homologues chimiques en raison de leurs avantages inhérents, tels qu'une toxicité réduite et une biodégradabilité accrue. Par conséquent, elles sont devenues des candidats prometteurs pour de nombreuses applications dans divers domaines, notamment la bioremédiation, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, l'alimentation, l'agriculture et les secteurs pétroliers [268,269]. La composition structurelle des biosurfactants (BS) peut être classée en trois catégories principales : les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides ou lipopeptines polymériques [270,271].

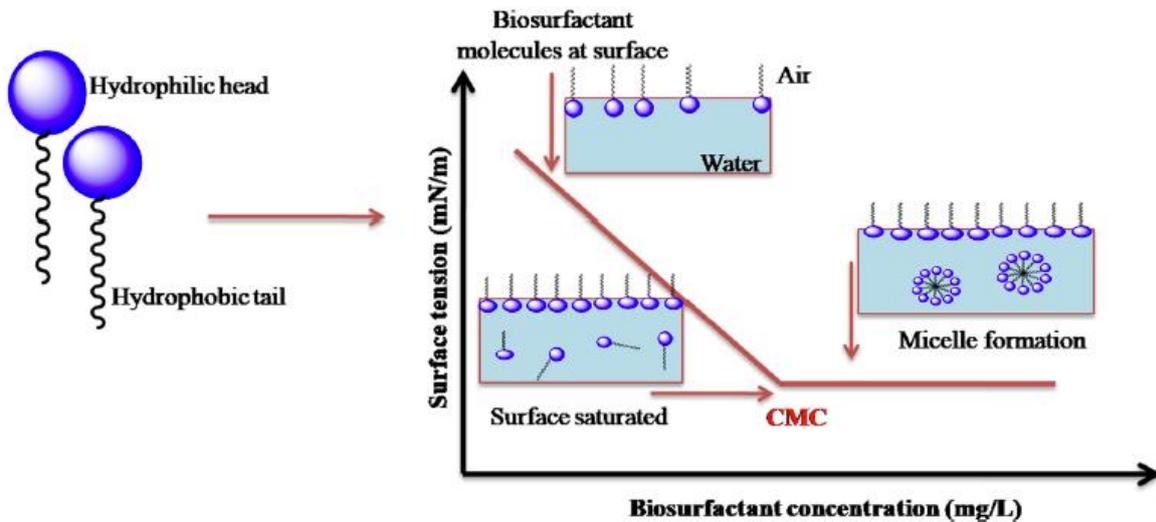


Figure 5 : Concentration critique en micelles (CMC) et formation de micelles par les agents tensioactifs biologiques [266].

4.2. Structure chimique et classification des biosurfactants

La classification des biosurfactants est principalement basée sur leur structure chimique et leur origine [272], et sont aussi classés en fonction de leur poids moléculaire [273]. Il existe donc deux types de biosurfactants a) les surfactants d'origine microbienne tels que les glycolipides, les lipopeptides, les surfactines, la lichenysine et les phospholipides (Fig. 6) [272,274] et b) les tensioactifs d'origine végétale tels que la saponine [275,276].

Du point de vue du poids moléculaire, ils peuvent être classés en deux catégories différentes [277,278]: (1) Les composés tensioactifs de faible poids moléculaire, connus sous le nom de biosurfactants, réduisent efficacement la tension superficielle air/eau et la tension interfaciale aux interfaces huile/eau [279], Ce groupe comprend les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides [278,280]; et (2) Les agents à haut poids moléculaire sont réputés pour être des bio émulsifiants plus efficaces en tant que stabilisateurs d'émulsion [278–280].

En effet, les biosurfactants sont classés comme cationiques, anioniques, neutres ou amphotères, en fonction de la charge électrique liée à la partie polaire de la molécule [281]. Bien que les agents de surface anioniques aient été historiquement les plus utilisés, les agents de surface neutres sont de plus en plus répandus à long terme [273].

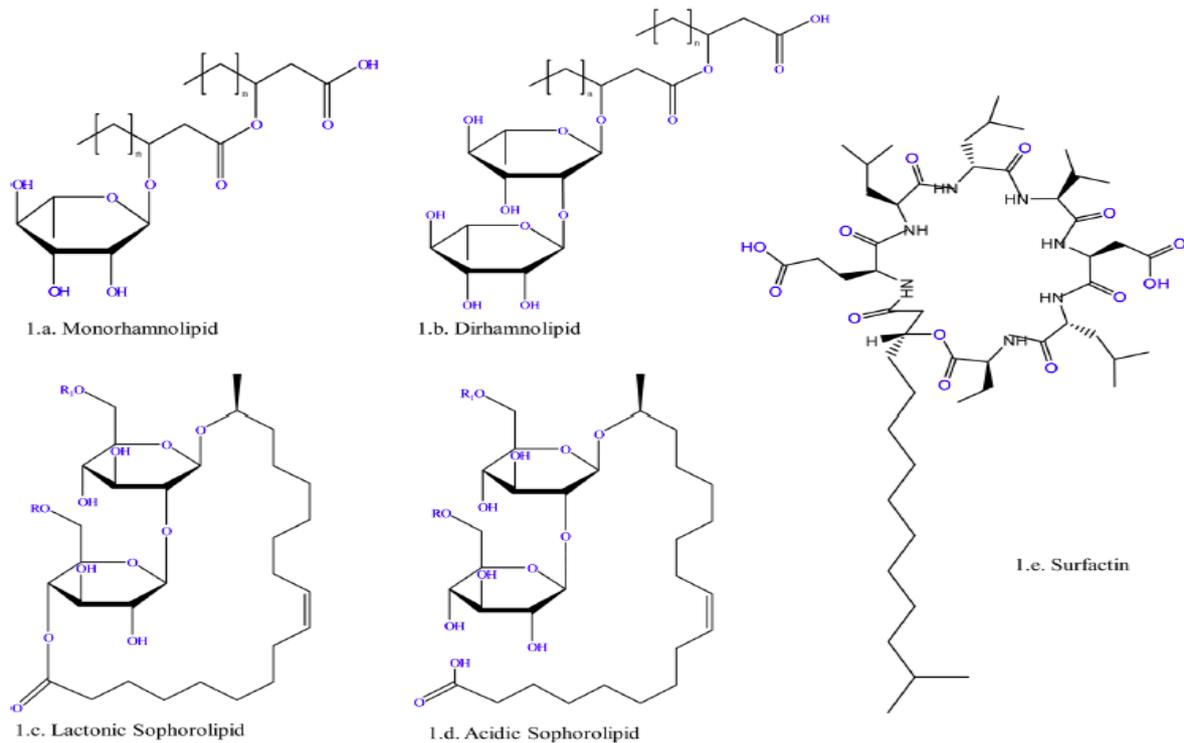


Figure 6 : Mono-rhamnolipid (a), Di-rhamnolipid (b), Sophorolipide lactonique (c), Sophorolipide acide (d), et Surfactine (e) [417].

4.2.1. Glycolipides

En ce qui concerne leur activité de surface élevée, les glycolipides, produits principalement par *Pseudomonas aeruginosa* sous forme de rhamnolipides, ont reçu le plus d'attention. Cette bactérie bien connue et facile à cultiver, le rendement de rhamnolipides en quantités est relativement élevé après des périodes d'incubation absolument courtes. Aussi, ils font partie des facteurs de virulence liés à la pathogenèse des infections à *Pseudomonas aeruginosa* [282]. La production de rhamnolipides est nécessaire pour les voies métaboliques et la régulation des gènes, et contribuent également à la diversité des espèces microbiennes [283].

Les sophorolipides sont un autre type de glycolipides principalement synthétisés par les levures telles que les espèces de *Candida*, et constitués d'un sucre dimère attaché par une liaison glycosidique à un acide gras hydroxyle où la configuration de l'acide gras et la longueur de la chaîne de carbone d'un sophorolipide donné peuvent différer selon la source de carbone utilisée pour le produire [284]. La portion de sucre représente une molécule de sophorose qui peut être acétylée à deux endroits, et la chaîne carbonée a une longueur de 16 à 18

atomes, comprend une ou plusieurs doubles liaisons, ou est saturé. Selon l'organisation de la chaîne des acides gras, il existe deux sous-types majeurs de sophorolipides : la chaîne ouverte caractérise le sophorolipide acide qui se termine par un groupe acide carboxylique, alors qu'une structure en anneau fermé caractérise le sophorolipide lactonique où la chaîne est rattachée à la molécule de sophorose [285].

En plus des deux glycolipides mentionnés ci-dessus, les tréhalolipides sont une classe de glycolipides synthétisés par *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia*, contenant un disaccharide non réducteur avec deux molécules de glucose liées entre elles via une liaison α , α -1, 1-glycosidique, et des acides gras à longue chaîne d'acide mycolique estérifiée en position C6 de chaque glucose [33,286].

4.2.2. Lipopeptides

Les lipopeptides font partie des biosurfactants les plus connus et sont principalement produits par des espèces de *Bacillus*. Leur structure se compose d'un fragment peptidique liée à un acide gras [287]. La surfactine reste la famille la plus étudiée parmi les lipopeptides, qui consiste en un heptapeptide conjugué avec un acide gras β -hydroxy d'une longueur de chaîne de 12 à 16 carbones atomes générant une structure cyclique de lactone [288]. De plus, il existe d'autres décrites familles de lipopeptides, dont les fengycines, les iturines, les kurstakins, les bacillomycines et les mycosubtiline [289].

4.2.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Les acides gras, les phospholipides et les lipides neutres, qui sont considérés comme des biosurfactants, sont produits en tant que métabolites extracellulaires par l'oxydation microbienne des alcanes, qui permet l'absorption de substrats hydrophobes par les micro-organismes [272,290]. Une unité de glycérol estérifiée à deux acides gras et à un groupe phosphate est présente dans tous les phospholipides, et la longueur de la chaîne d'hydrocarbures est liée au rapport hydrophilie/lipophilie [291,292]. Les acides gras les plus courants sont les acides corynomycoliques et d'autres acides gras hydroxylés qui ont été révélés être des biosurfactants beaucoup plus efficaces que les acides gras simples [292]. Les composés lipophiles tels que les

triacyglycérols, les diacyglycérols, les esters de cire et les polyhydroxycarboxylates font partie des lipides neutres extracellulaires produits par les bactéries marines dégradantes [293]. La majorité des phospholipides sont des phosphatidyléthanolamines [292,294].

4.2.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymères émulsan, biodispan, alasin, et le liposan sont largement reconnus comme émulsifiants [295]. Parmi ceux-ci, l'émulsan est le mieux documenté, et il est principalement constitué d'un squelette hétéropolysaccharidique à laquelle des acides gras sont attachés de manière covalente par des liaisons o-esters. La partie polysaccharide présente différentes formes de sucre dont la D-galactosamine, l'acide D-galactosaminuronique, D-glucose, L-rhamnose, D-mannose et acide D-glucuronique [287], alors que le liposan est constitué d'un mélange de glucides et de protéines [272].

4.3. Micro-organismes producteurs de biosurfactants

Une fois que la croissance microbienne a atteint une densité cellulaire élevée, les biosurfactants sont généralement produits en phase exponentielle ou phase stationnaire [296]. Ils peuvent se trouver à l'intérieur des cellules (intracellulaires) ou être sécrétés à l'extérieur des cellules (extracellulaires) [297].

Les biosurfactants microbiens jouent un rôle fonctionnel clé dans l'absorption de substrats hydrophobes par les microorganismes ; ils sont également impliqués dans chaque phase de la formation du biofilm en favorisant la motilité afin d'éviter l'adhésion des cellules aux substrats. En outre, les canaux fluidiques qui permettent la circulation de l'oxygène et des nutriments à l'intérieur du biofilm, et l'élimination des produits de dégradation, sont maintenus par les biosurfactants. En plus, la capacité des biosurfactants à réduire la tension superficielle des surfaces favorise différents types de motilité des bactéries comme l'essaimage et la contraction [298].

De nombreux biosurfactants ont été produits par des bactéries de nombreux genres différents, y compris *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium* et *Acinetobacter* [279], qui peuvent produire des biosurfactants naturellement ou en réponse à un stress [299]. Les actinomycètes et les champignons, en plus des bactéries, produisent aussi des biosurfactants [300], comme la production de

sophorolipides par la levure *Candida* [301,302], et parmi les biosurfactants les mieux décrits produits au sein de la classe des *Actinomycetes* sont des glycolipides à base de glucose, dont la majorité possède un squelette hydrophile composé de glycosides liés par des liaisons glycosidiques, générant un groupement de tréhalose [303].

4.4. Applications des biosurfactants dans la biotechnologie environnementale

Les biosurfactants sont des produits ayant un vaste potentiel industriel (biorestauration, cosmétiques, production d'aliments) [304]. Dans différents aspects de la biotechnologie environnementale, les biosurfactants peuvent être utilisés de pour récupérer les hydrocarbures dans les réservoirs de stockage, dans le nettoyage des déversements de pétrole, et la bio dépollution du sol et de l'eau [305,306]. Comme cela a été démontré précédemment, les espèces *Pseudomonas* et *Bacillus* sont le plus souvent signalées comme productrices de biosurfactants et peuvent être efficacement appliquées dans différentes technologies de bioremédiation. Les principales applications environnementales sont détaillées dans les sections suivantes sections.

4.5. Remobilisations des métaux lourds

Dans la galaxie chimique, les deux principaux polluants environnementaux sont les métaux lourds et les HAPs [307,308]. Le problème de la pollution par les métaux lourds est étroitement lié avec sa toxicité pour les plantes, les animaux et les humains et son manque de biodégradabilité [241].

Aussi, les métaux lourds provoquent de multiples types de dysfonctionnements du système biologique et peut causer la mort [309]. Arsenic, cadmium, le chrome, le plomb et le mercure sont parmi les priorités métaux importants pour la santé publique en raison de leur forte toxicité [310]. Une gamme de processus à médiation bactérienne peuvent améliorer la mobilité des métaux, y compris les interactions des métaux avec composants membranaires des bactéries (p. ex. pigments, polymères...) et comme par exemple la production de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices [311]. Plusieurs études ont prouvé le rôle important des biosurfactants dans la remobilisation des métaux lourds de l'environnement en facilitant leur solubilisation, dispersion, et désorption [312–314].

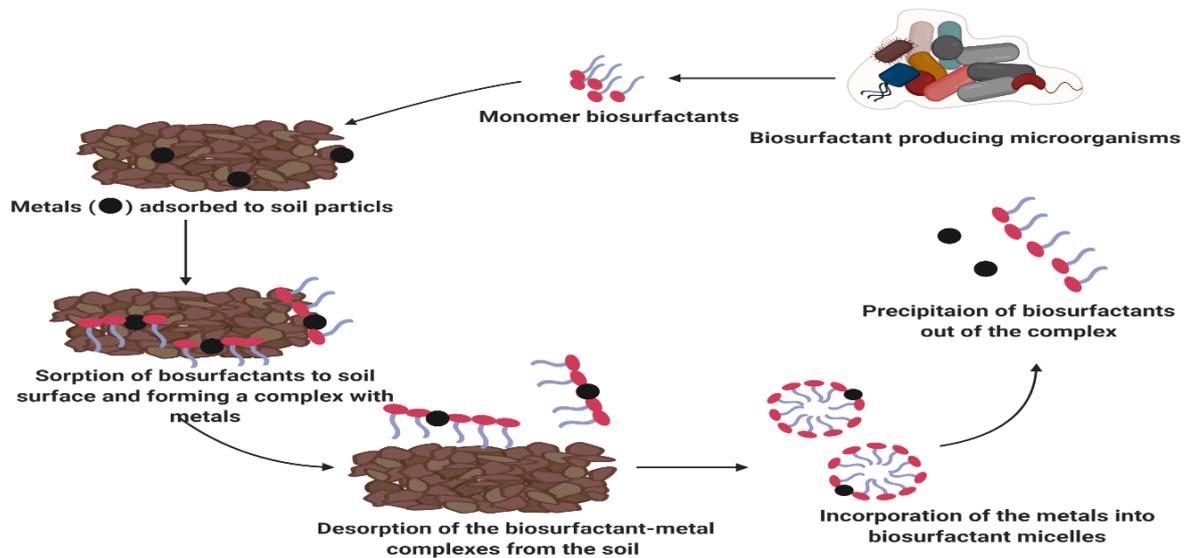


Figure 7: Remobilisation des métaux lourds par des biosurfactants microbiens [32].

Comme montre la figure ci-dessus, ces métabolites peuvent former des complexes avec les métaux lourds à l'interface entre les sols, désorber les métaux de la matrice du sol, incorporer des métaux dans des micelles de biosurfactants, et ainsi augmenter la solubilité des métaux et la biodisponibilité du sol [315]. Il est intéressant de noter que des preuves significatives suggèrent que les biosurfactants peuvent augmenter la mobilisation des métaux lourds dans les sols pollués [312–314,316]. En fonction de la charge électrique des biosurfactants, et grâce à des liaisons ioniques, les biosurfactants anioniques peuvent former des complexes non ioniques avec des métaux conduisant à leur détachement du sol (Fig. 7). L'échange d'ions permet le biosurfactant cationique pour rivaliser et remplacer des similaires ions métalliques pour les surfaces chargées négativement [315]. De plus, les biosurfactants microbiens peuvent être impliqués dans d'autres mécanismes de remobilisation des métaux lourds, tels que la phytoremédiation modulée par les microorganisme-plant et la bioremédiation des métaux lourds médiée par les biofilms, qui ont s'est avéré être un moyen essentiel d'améliorer remédiation des métaux lourds, désintoxication, et médiation durable et dynamique des nutriments des plantes [239,274,309].

4.6. Remobilisation des HAPs

Les HAPs sont des contaminants du sol très répandus, et sont considérés comme des polluants prioritaires en raison de leur cancérogénicité [317]. Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans la dégradation des HAPs dans le sol [250]. Il existe deux types principaux de microorganismes qui participent à la biodégradation des HAPs : les bactéries aérobies et anaérobies/la dégradation métabolisme. Les mécanismes aérobies reposent sur l'oxydation de l'anneau aromatique, suivie d'une décomposition systématique du composé en métabolites des HAPs et/ou en dioxyde de carbone, tandis que le métabolisme anaérobie des HAPs est supposé par l'hydrogénation du cycle aromatique [251].

Un autre moyen d'améliorer la bioremédiation des HAPs est la production de biosurfactants, qui peuvent accroître la solubilité apparente des HAPs, augmentant ainsi leur mobilité et leur biodégradabilité [63,252–254]. Ces molécules biosourcées sont probablement plus préférables lorsqu'elles sont produites par les microorganismes dégradants eux-mêmes. Dans en plus de la biodisponibilité accrue des contaminants, les biosurfactants agissent pour améliorer la biodégradation [317] en modifiant les propriétés de la surface des cellules bactériennes ou en impliquant la solubilisation et l'émulsification de ces hydrocarbures [318], ce qui entraîne une réduction de la tension superficielle autour de la bactérie, ainsi que de la tension interfaciale entre la paroi cellulaire bactérienne et l'hydrocarbure [319]. Il est de plus en plus évident que les interactions entre les polluants et les biosurfactants de la matrice contaminante peuvent modifier les propriétés des membranes cellulaires et augmenter l'adhésion microbienne, ce qui affecte l'efficacité de la biodégradation [289,320,321].

Il existe deux mécanismes permettant d'améliorer la vitesse de désorption des HAPs dans le sol : la solubilité micellaire et la modification directe de la matrice du contaminant. La solubilisation micellaire consiste à diviser les HAPs en micelles de tensioactifs lorsque les surfactants dépassent la concentration micellaire critique (CMC), ce qui entraîne une augmentation de la vitesse de désorption en maximisant le gradient de concentration entre les phases absorbante et aqueuse [322]. Des concentrations plus élevées de tensioactifs sont généralement nécessaires pour ce processus, car la solubilité des hydrocarbures dans la solution dépend entièrement de

la concentration de l'agent de surface [323]. Le processus de mobilisation se déroule en dessous de la CMC du biosurfactant. Une fois que les micro-organismes sont en

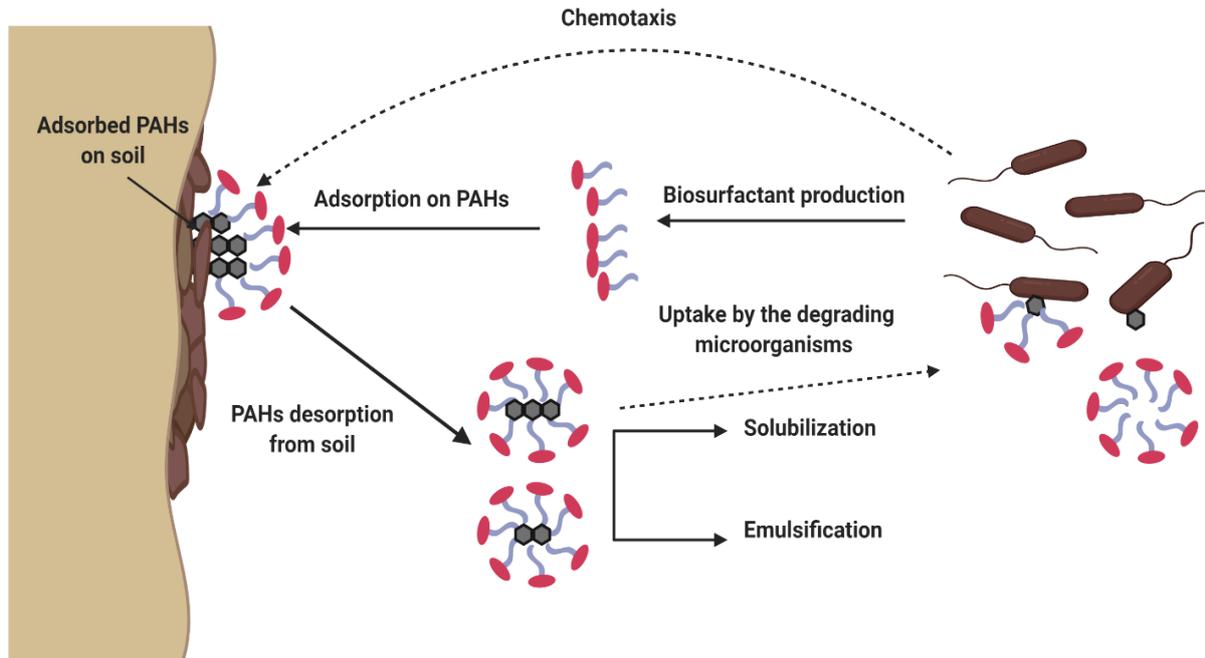


Figure 8 : Un processus simplifié d'activité des biosurfactants pour une meilleure compréhension de la bioremédiation des hydrocarbures dans le sol [32].

contact étroit avec le sol pollué, et grâce aux mécanismes de chimiotaxie (Fig. 8) [324], les micro-organismes dégradant les polluants se dirigent vers les HAPs et commencent à produire des biosurfactants monomères qui adsorbent et entourent ces polluants, ce qui permet leur désorption du sol par la formation de micelles (Fig. 8). Les micelles entourées de HAPs facilitent la solubilisation, l'émulsification et la biodégradation des hydrocarbures [295,325].

4.7. Récupération microbienne du pétrole (MEOR)

La récupération du pétrole par voie microbienne est l'un des domaines d'application les plus importants pour les biosurfactants dans l'industrie pétrolière [279,311,326]. Ce procédé est une technologie essentielle de récupération tertiaire, qui utilise des micro-organismes et leurs métabolites pour la récupération du pétrole résiduel [327–329]. Ces métabolites, qui peuvent comme agents de surface (molécules amphiphiles), permettent de remplacer les tensioactifs chimiques et d'améliorer la durée de vie des réservoirs matures [279,330]. Les biosurfactants sont efficaces en réduisant tension superficielle et interfaciale, l'altération de la

mouillabilité, et la formation d'émulsions huile/eau ou eau/huile [331]. Ces caractéristiques permettent au biosurfactant d'être un candidat approprié pour la récupération du pétrole [332]. La récupération du pétrole microbienne (MEOR) (Fig. 9) est basée sur l'injection d'eau de contenant des micro-organismes, des nutriments et/ou des biosurfactants qui amélioreront l'émulsification et la mobilité du pétrole en réduisant les tensions de surface et d'interface.

Ces propriétés des biosurfactants permettent de récupérer d'importantes quantités de pétrole dans les puits [331,333]. Récupération de pétrole améliorée par les microorganismes produisant de biosurfactants peut être appliquée *in situ* ou *ex situ* [331]. *In situ*, les bactéries productrices de biosurfactants et leurs nutriments sont injectés dans les réservoirs de pétrole, et les biosurfactants produits sont ensuite utilisés dans les réservoirs de pétrole en augmentent la récupération du pétrole [334,335]. Dans le système *ex situ*, les agents tensioactifs sont d'abord produits par fermentation aérobie dans, puis injectés dans réservoirs de [335–337] ; cette méthode souffre techniques de biotraitement complexes et des coûts élevés de produits [338]. Ainsi, la production *in situ* de biosurfactants dans les réservoirs de pétrole est plus pour les applications de récupération du pétrole par voie microbienne en raison de la rentabilité et de la simplicité de la mise en œuvre [334]. En outre, il s'agit toujours de l'application privilégiée dans les cas où l'injection de nutriments sélectifs sur mesure pour stimuler les microorganismes indigènes producteurs de biosurfactants, soit l'injection de réservoirs de pétrole avec des micro-organismes exogènes producteurs de biosurfactants avec des nutriments [331].

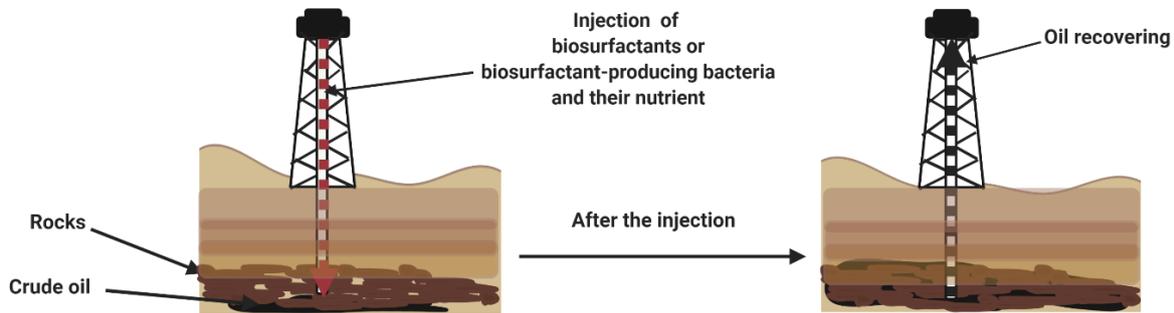


Figure 9 : Principes de l'application microbienne assistant la récupération du pétrole [32].

4.8. Bioremédiation des pesticides

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées pour prévenir et lutter contre divers organismes nuisibles, notamment les bactéries, les virus, les champignons, les insectes, les nématodes, les mauvaises herbes, la flore et la faune indésirables [261]. Cependant, la pollution par les pesticides est devenue une grave préoccupation environnementale. Les pesticides peuvent s'accumuler dans les plantes, le sol et les organismes et se retrouvent dans l'eau et les aliments [5].

Outre les métaux lourds et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les biosurfactants peuvent être un candidat à la bioremédiation pour une large gamme de résidus de pesticides [339]. L'un des mécanismes d'action des biosurfactants est basé sur la formation de complexes micelles biosurfactant-pesticide, qui interagissent avec les liaisons hydrogène des molécules d'eau, ce qui permet d'obtenir une meilleure solubilisation des pesticides [340]. Plusieurs rapports ont été publiés sur les propriétés possibles de nombreuses bactéries telles que *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp et *Acinetobacter* sp, en tant que producteurs de biosurfactants, qui éliminent les métaux lourds des sols contaminés et en même temps accélérer la biodégradabilité des pesticides [323]. De multiples rapports soulignent le succès de l'utilisation de biosurfactants pour améliorer la récupération du plomb et du cadmium et l'élimination du pesticide lindane [341]. Aussi, les biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* a montré un taux de biodégradation très élevé des pesticides organophosphorés [342]. En autre étude récente, un glycolipide et un

glycopeptide produit par *Pseudomonas rhodesiae* et *Pseudomonas marginalis*, ont présenté respectivement une capacité significative à augmenter le taux de dégradation des insecticides [343]. Dans un brevet, il a été noté que les arachnides, les œufs, et les larves ont tous été contrôlés avec succès avec des biosurfactants glycolipides [344]. De plus, l'observation microscopique des pucerons traités au rhamnolipide a permis d'identifier le mécanisme insecticide comme étant l'endommagement de la membrane cuticulaire [345].

5. Rhamnolipides

5.1. Introduction

Les rhamnolipides sont les biosurfactants les plus attrayants et les plus largement rapportés dans la recherche actuelle en raison de leurs propriétés physicochimiques ainsi que de leurs activités de surface et d'interface, d'émulsification et de solubilisation [346]. En plus de leur efficacité dans des conditions environnementales extrêmes, ils sont connus pour leur acceptabilité écologique [9]. La demande énorme et le coût élevé des rhamnolipides obligent les chercheurs à se concentrer sur l'amélioration de la production et l'optimisation des conditions pour obtenir un rendement élevé. Différentes stratégies ont été conçues et sont actuellement employées et explorées pour réduire les coûts de la production de biosurfactants [347]. Récemment, les rhamnolipides peuvent également être produits en grandes quantités après de courtes périodes d'incubation à partir de substrats renouvelables et peu coûteux tels que les huiles végétales usées [9,346]. Bien que les bactéries puissent donner des rendements plus élevés de rhamnolipides avec des hydrocarbures comme substrat [9,142]. Pour ces raisons, ces composés amphiphiles biosourcés sont considérés comme "verts" pour l'environnement car ils sont biodégradables, non toxiques et économiques [21,348].

Dernièrement, les rhamnolipides ont fait l'objet d'une grande attention et sont principalement produits par de nombreuses souches de *Pseudomonas aeruginosa* et des espèces associées. Les propriétés physicochimiques et biologiques désirables des rhamnolipides sont applicables dans plusieurs domaines divers, y compris les industries thérapeutiques, biomédicales et pharmaceutiques. En fait, les biosurfactants sont largement utilisés dans de nombreux domaines tels que l'industrie pétrochimique, la bioremédiation dans les systèmes de protection de l'environnement, l'alimentation, la cosmétique, l'agriculture, et la biomédecine [9,349,350]. Le présent chapitre met en évidence les différentes stratégies et conditions de production des rhamnolipides.

5.2. Structure et classification des rhamnolipides

Pseudomonas aeruginosa est la principale productrice de rhamnolipides dans des conditions aérobies et anaérobies des deux principales structures glycolipidiques (Fig. 10), les mono ou les di-rhamnolipides, ou les deux ensemble [351]. Les rhamnolipides sont principalement composé d'un groupe de glucides lié aux acides gras [345]. La partie glucidique est constituée de mono-rhamnolipide ou di-rhamnolipide, et les moitiés rhamnose sont liés par une liaison α -1,2-glycosidique. La partie non glycosidique se compose principalement d'un ou de deux (dans de rares cas, trois) chaînes d'acides gras β -hydroxylés (saturés, mono- ou polyinsaturés), avec une longueur de chaîne allant de C8 à C16 attachées par une liaison ester entre le groupe β -hydroxyle de la chaîne distale (par rapport à la liaison glycosidique) et le groupe carboxyle de la chaîne proximale [282].

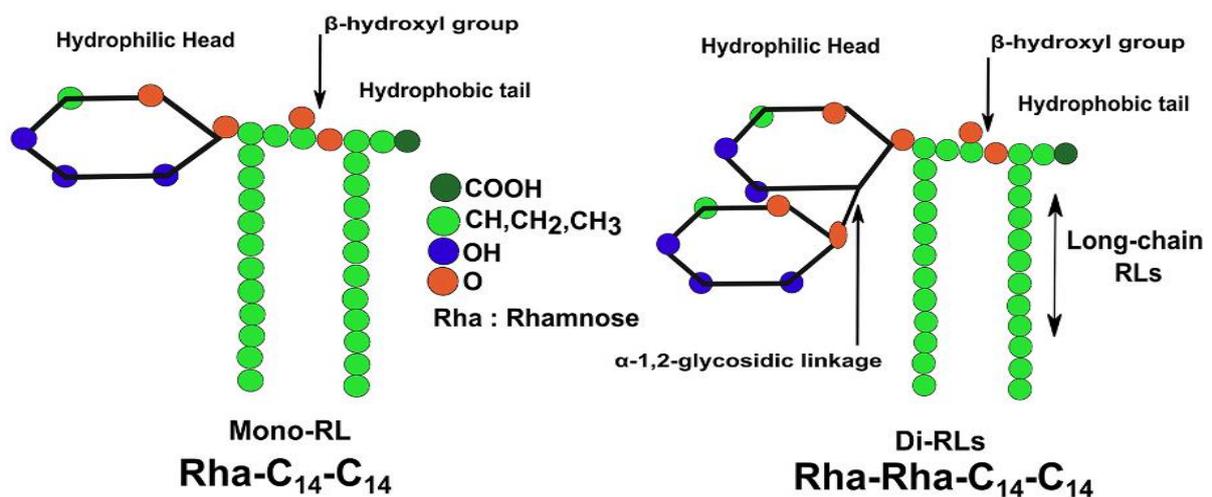


Figure 10 : Structure chimique des deux principaux types de rhamnolipides. [374].

5.3. Synthèse des rhamnolipides et voies métaboliques

La voie de biosynthèse des rhamnolipides, qui est un réseau complexe, est réticulée avec la formation de différentes espèces de polysaccharides (Fig. 11). La voie a été étudiée par Dobler [352], dans laquelle la synthèse de rhamnolipides est étroitement liée à la formation de divers polysaccharides. Leur partie hydrophobe est produite *via* des synthétases d'acides gras de type II (FAS II) [353]. La synthèse des moitiés d'acides gras présents dans les N-acyl homoserine lactones (AHL) et les 4-

hydroxyl-2-alkylquinolens (HAQ) est étroitement liée, avec des étapes communes dans leur formation [354]. Initialement, on pensait que l'enzyme RhlG jouait un rôle dans le détournement des composants d'acides gras de leur voie biosynthétique habituelle. Cependant, des études ont montré que RhlG n'est pas impliqué dans la biosynthèse des rhamnolipides, contrairement à RhlA, qui joue un rôle pivot dans la conversion des intermédiaires β -D-hydroxyacyl-ACP en composants de rhamnolipides [355]. La partie lipidique des rhamnolipides est probablement synthétisée de novo. Des recherches ont montré que l'expression des facteurs de virulence, y compris les rhamnolipides, est affectée par les enzymes de β -oxydation des acides gras [356]. La β -oxydation joue un rôle important dans la fourniture de précurseurs lipidiques pour la biosynthèse des rhamnolipides, suggérant une connexion métabolique entre ces deux processus [357]. Trois enzymes majeures, RhlA, RhlB et RhlC, interviennent dans la biosynthèse des rhamnolipides. RhlA catalyse la synthèse du dimère d'acides gras des rhamnolipides et de l'acide 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanolique (HAA) libre, tandis que les rhamnosyltransférases RhlB et RhlC catalysent le transfert de L-rhamnose activé soit au HAA, soit à un mono-rhamnolipide préalablement généré [358]. Le précurseur du dTDP-L-rhamnose, nécessaire pour la partie hydrophile des rhamnolipides, est dérivé des voies métaboliques de l'Entner-Doudoroff et de la gluconéogenèse. La génération de L-rhamnose actif commence par la conversion du D-glucose-6-phosphate en D-glucose-1-phosphate, suivi par les produits du gène de l'opéron *rmLBDAC* [359,360]. L'enzyme RmLA, qui catalyse le transfert d'un nucléotide thymidylmonophosphate au glucose-1-phosphate, joue un rôle régulateur dans la synthèse du dTDP-L-rhamnose. Ce dernier agit comme un produit inhibiteur dans sa propre synthèse, influençant ainsi toutes les voies métaboliques liées, y compris la synthèse des rhamnolipides [361].

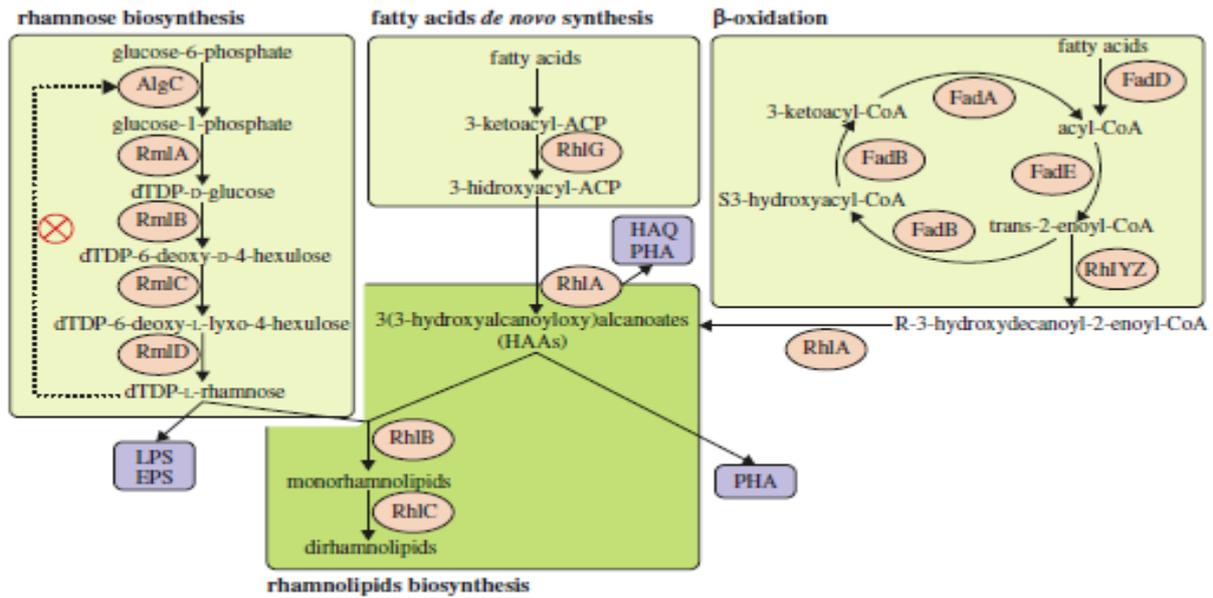


Figure 11 : Voie de biosynthèse des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* [352].

5.4. Régulations génétiques de la biosynthèse des rhamnolipides

Le processus de synthèse des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* suit une voie séquentielle qui comprend trois gènes primaires, à savoir *rhlA*, *rhlB* et *rhlC*. Ces gènes sont responsables du codage de trois enzymes distinctes impliquées dans la synthèse des rhamnolipides [362]. Le terme "produit du gène" fait référence à la molécule fonctionnelle ou à la protéine produite à la suite de l'expression du gène. L'enzyme *RhlA*, également connue sous le nom de rhamnosyltransférase A, est responsable de la facilitation de la synthèse de la partie acide gras et des 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alcanoates (HAA). Le processus implique l'addition enzymatique d'une molécule libre de HAA au dTDP-L-rhamnose, facilitée par l'enzyme *RhlB* (rhamnosyltransférase B), ce qui entraîne la formation de mono-rhamnolipides. Les mono-rhamnolipides subissent une conversion ultérieure en di-rhamnolipides par l'activité enzymatique de *RhlC*, à savoir l'ajout d'une molécule supplémentaire de dTDP-L-rhamnose. Les gènes *rhlA* et *rhlB* sont colocalisés à l'intérieur du même opéron, tandis que *rhlC* est situé dans une région génomique distincte du régulon *rhl* [363].

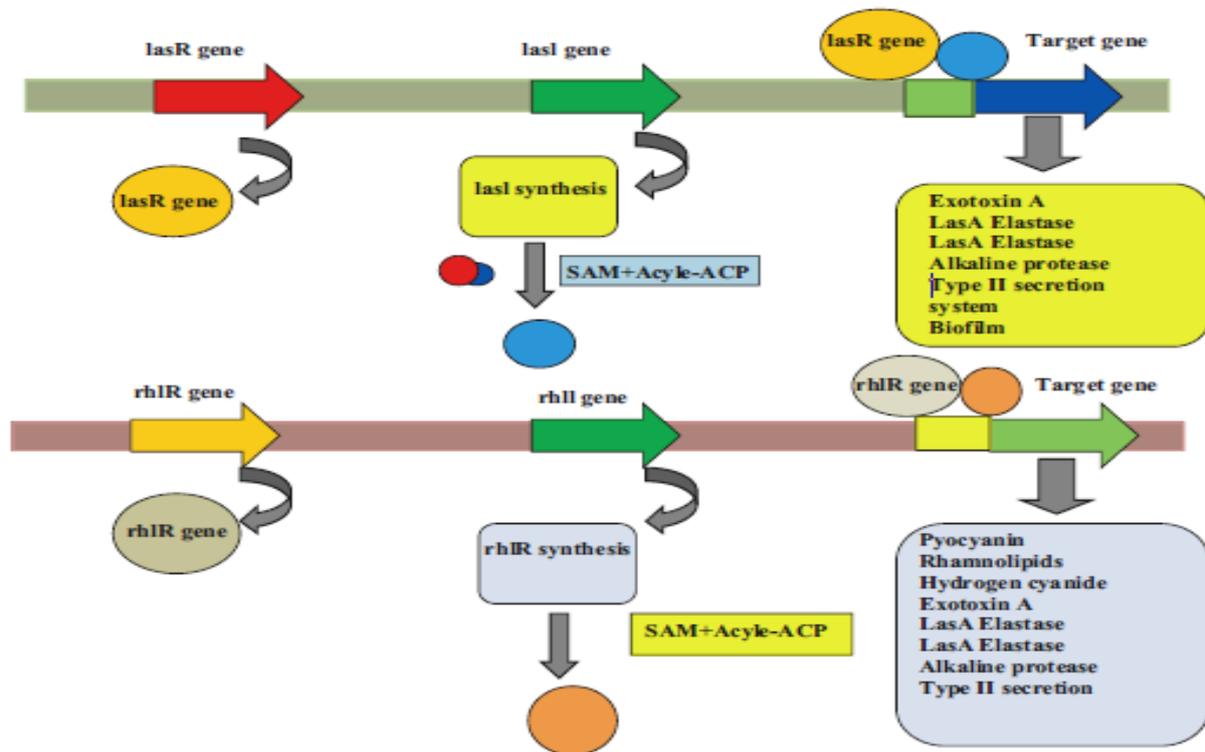


Figure 12 : Les gènes régulant le système quorum-sensing chez *P. aeruginosa* [524].

5.4.1. Synthèse des rhamnolipides régulée par le système quorum-sensing

Les systèmes de quorum sensing (QS) sont des systèmes de communication cellulaire bactérienne qui comprennent la biosynthèse, la sécrétion et la détection de molécules de signalisation connues sous le nom d'auto-inducteurs (AI) [364]. Les mécanismes de QS au sein des populations bactériennes peuvent produire un comportement synchronisé et coordonné une fois qu'un certain quorum est atteint. Les systèmes régulateurs de QS sont répandus chez les bactéries, contrôlant une grande variété de comportements biologiques [364]. Un système régulateur de QS typique est composé d'une synthase de signal, d'une protéine réceptrice de signal et d'une molécule de signal. Chez *P. aeruginosa*, les systèmes QS principaux sont las et rhl (Fig. 12): les synthases LasI et RhII produisent leurs molécules de signal, les homosérine lactones 3OC12-HSL et C4-HSL. Ces molécules de signal se lient et modulent leur régulateur transcriptionnel correspondant, LasR et RhIR, respectivement [365]. Le système las nécessite également RsaL, une protéine répresseur pour lasI et lasR, régulant à la baisse l'expression de ces deux gènes et affectant indirectement la biosynthèse des rhamnolipides [366].

Un troisième système QS, le signal quinolone de *Pseudomonas* (PQS), est impliqué dans la régulation positive de la biosynthèse des rhamnolipides. Le récepteur PqsR (ou MvfR) médie l'expression des grappes de gènes *phnAB*, *pqsABCD* et *pqsH*, tous liés à la biosynthèse des signaux quinolones, des 4-hydroxy-2-alkylquinolones (HAQ) et du signal quinolone de *Pseudomonas* (PQS), le 2-heptyl-3-hydroxi-4-quinolone [367,368]. La biosynthèse de PQS est promue par les produits géniques de l'opéron *pqsABCD* et se lie à PqsR (MvfR) (Fig. 13), un régulateur de type LysR. L'expression de PqsR est induite par le système *las* et réprimée par le système QS *rhl*, dans un réseau régulateur typiquement complexe. La production de PQS atteint son maximum en phase stationnaire tardive [369], une cinétique de production similaire à celle des rhamnolipides. Les mutants knockout de *pqsR* et *pqsE* ont des niveaux de production de rhamnolipides diminués, même lorsqu'ils sont alimentés avec du C4-HSL exogène [370]. Cette découverte indique un rôle direct de PqsR et PQS dans la biosynthèse des rhamnolipides.

Certains gènes régulés par QS répondent spécifiquement au régulon *rhl*, comme l'opéron *rhlAB* (Fig. 13), qui affecte directement l'expression des enzymes biosynthétiques des rhamnolipides [371]. Dans le cas de LasR, il semble jouer un rôle direct dans le contrôle des systèmes *rhl* et *pqs* (Fig. 13). La transcription de *rhlI* est activée par le complexe LasR-3OC12-HSL de manière dépendante de *las*, établissant une hiérarchie QS classique basée sur LasR. Cependant, il a été rapporté que l'expression du système *rhl* est toujours maintenue dans un mutant *lasR*-minus, et que RhlR contrôle partiellement certains gènes liés à LasR en l'absence de LasR [365]. La production de rhamnolipides chez *P. aeruginosa* est directement liée au régulateur transcriptionnel RhlR, qui agit soit comme activateur via le complexe RhlR-C4-HSL, soit comme répresseur en l'absence d'auto-inducteur [370]. Également lié au système QS *las* est Vfr, un régulateur global du facteur de virulence chez *P. aeruginosa*. Vfr est une protéine liant le cAMP, connue pour activer directement l'expression de LasR et RhlR [370].

Le régulateur transcriptionnel QscR, un membre homologue de la famille Lux, semble jouer un rôle dans l'intégration entre les systèmes QS *las* et *rhl* [372], se liant à LasR et RhlR de manière réversible, à faibles niveaux de AHL. Lorsque la concentration de AHL augmente, des complexes stables QscR-AHL se forment. En conséquence, lorsque QscR se dissocie de LasR et RhlR, des complexes d'activation

transcriptionnelle LasR-3OC12-HSL et RhIR-C4-HSL se forment [373]. Ce mode d'action explique pourquoi l'opéron *rhlAB* est réprimé par QscR pendant la phase exponentielle [372].

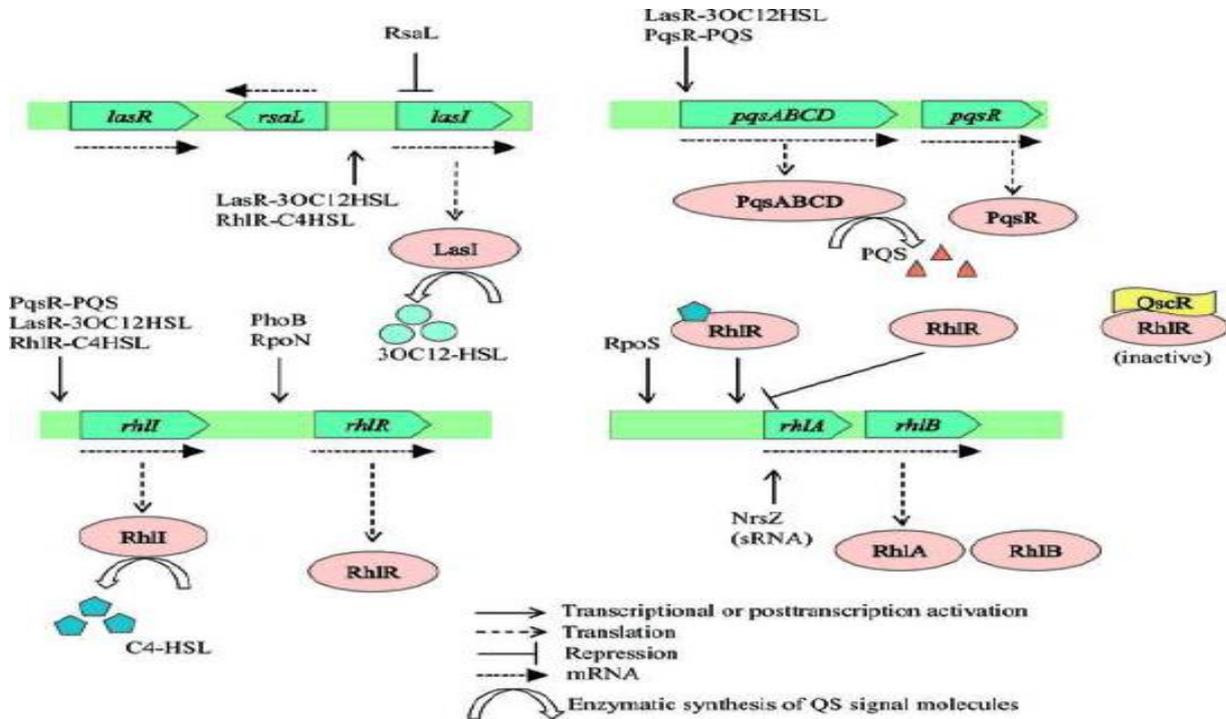


Figure 13 : Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la biosynthèse de rhamnolipides chez *P. aeruginosa* [352].

5.4.2. Ingénierie et amélioration de la production de rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants polyvalents et prometteurs pour des applications commerciales en raison de leurs propriétés utiles, telles que leur faible toxicité et leur production à partir de sources renouvelables [346,374].

Cependant, leur coût élevé de production limite leur utilisation, ce qui a conduit à l'exploration de diverses stratégies pour améliorer leur rendement [279,352]. Deux principales approches ont été privilégiées : l'ingénierie métabolique et l'optimisation des paramètres du processus. L'ingénierie métabolique implique la modification de souches bactériennes pour augmenter la production de rhamnolipides, en se concentrant sur les enzymes de biosynthèse et les protéines de régulation génique [279].

Plusieurs études ont réussi à créer des souches bactériennes génétiquement modifiées, principalement des Pseudomonades, avec une production accrue de

rhamnolipides [352]. Des approches complémentaires ont été explorées, telles que l'utilisation de protéines comme l'hémoglobine de *Vitreoscilla* pour améliorer la production [375,376]. Des recherches ont également mis en lumière le rôle de certaines protéines, notamment EstA et LipC, dans la régulation de la production de rhamnolipides [377–379].

La majorité des données ont été acquises grâce à l'utilisation de rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*, qui sont principalement composés de Rha-Rha-C10-C10. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui affecte les humains, les animaux et les plantes, ce qui réduit l'intérêt de son utilisation dans diverses applications industrielles et environnementales [184,374,380].

De plus, les chercheurs ont envisagé d'exprimer des gènes de *P. aeruginosa* dans des hôtes bactériens non pathogènes pour augmenter la production de rhamnolipides comme *Pseudomonas stutzeri* [381]. Récemment, une approche potentielle pour résoudre ce problème implique l'identification de nouvelles souches non pathogènes qui possèdent des capacités inhérentes à métaboliser une vaste gamme de substrats et à synthétiser des métabolites secondaires grâce à la présence d'une grande variété d'enzymes [380]. Les tentatives d'utiliser des souches GRAS comme *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp Et autres souches de *Pseudomonas* sp comme alternative à *P. aeruginosa* pour la production de rhamnolipides ont donné des résultats promoteurs [184,352,374,380]. En fin de compte, l'ingénierie métabolique demeure un domaine de recherche crucial pour améliorer la production de rhamnolipides et rendre cette technologie plus économique [352].

5.5. Production de rhamnolipides

5.5.1. Microorganismes producteurs de rhamnolipides

Les rhamnolipides, principalement produits par *Pseudomonas aeruginosa*, une pathogène opportuniste humaine, suscitent des inquiétudes quant à leur sécurité et limitent leur utilisation dans divers domaines [382]. Cependant, malgré cela, l'utilisation des souches de *P. aeruginosa* et de leurs produits dans diverses applications biotechnologiques, y compris l'environnement, la médecine, et d'autres applications industrielles, a été largement étudiée [383]. De plus, Les

caractéristiques pathogènes présentés par les espèces de *Pseudomonas*, peuvent être relativement restreints dans certaines situations. Par exemple, lorsque ces microorganismes sont utilisés dans des bioréacteurs de divers types bénéficiant de contrôles appropriés sur les émissions liquides et gazeuses, ou lorsque d'autres mesures d'atténuation ou de confinement spécifiques sont mises en place [384].

En réponse, la recherche s'est orientée vers des microorganismes alternatifs producteurs de rhamnolipides. Par exemple, au sein du genre de *Pseudomonas*, les rhamnolipides sont également synthétisés par diverses espèces telles que *P. plantarii*, *P. cholographis*, *P. putida*, et *P. fluorescens* [385]. *Lysinibacillus sphaericus* IITR51 et *Planococcus* sp produisent des rhamnolipides aux propriétés antimicrobiennes [386,387]. *Enterobacter cloacae* BAGM01 produit des rhamnolipides stables à hautes températures et salinités, en utilisant diverses sources de carbone, y compris le diesel et l'huile de tournesol [388]. *Thermoanaerobacter* sp. CMCNRG TB177 et *Paraburkholderia* sp. C3 ont montré un potentiel dans la production de rhamnolipides en utilisant des sources de carbone alternatives comme la mélasse et le glycérol, un sous-produit du biodiesel, respectivement [389,390]. En outre, *Burkholderia thailandensis* E264, une souche non pathogène, a également été largement étudiée pour la production des rhamnolipides [349,380,391,392].

5.5.2. Facteurs influençant la production de rhamnolipides

La production de biosurfactants est influencée par plusieurs facteurs, qui peuvent être regroupés en facteurs environnementaux, génétiques, et opérationnels [393,394]. La maximisation de la production nécessite un équilibre soigneux et une optimisation des conditions environnementales, une sélection et une manipulation adéquates des souches bactériennes, ainsi que des stratégies opérationnelles précises [394].

5.5.2.1. Effet de différents nutriments

Le rendement final et le type spécifique de surfactant produit peuvent être considérablement influencés par le choix des substrats ou des nutriments [347]. Le carbone joue un rôle essentiel dans la détermination du rendement global [395]. En plus du carbone, d'autres éléments tels que l'azote, le phosphate et des éléments

traces, y compris les métaux et le fer, jouent également des rôles capitaux dans l'influence du rendement du produit final [347].

5.5.2.1.1. Carbon

Le type de substrats carbonés affecte significativement le rendement de production de biosurfactant [347,396], car la source de carbone affecte significativement à la fois la croissance du microorganisme et la structure ainsi que le taux de production de la molécule de biosurfactant souhaitée. Diverses sources de carbone, telles que le malt, la mélasse, la graisse animale, les huiles végétales, les résidus pétroliers, les produits pétroliers, les produits laitiers et les résidus de distillerie, ont été utilisées dans la production de biosurfactants [183,397].

Les sources de carbone sont généralement divisées en trois types principaux : les hydrocarbures, les glucides et les huiles végétales [347]. Différents microbes sélectionnent différents types de sources de carbone pour la synthèse de biosurfactant. Tandis que certains préfèrent des sources hydrophobes comme les huiles végétales [398] ou les hydrocarbures [9,28,142], d'autres pourraient opter pour des glucides [399,400], ou même un mélange de diverses sources de carbone [401], soit singulièrement, soit en combinaison, comme noté par plusieurs de chercheurs [396,402].

5.5.2.1.2. Phosphate

Pour que les micro-organismes synthétisent des biosurfactants, le phosphate est un ingrédient nécessaire [298]. Car, le phosphate est indispensable non seulement pour la viabilité des micro-organismes producteurs de biosurfactants mais aussi pour influencer la quantité et la qualité des biosurfactants synthétisés [403]. Un apport adéquat en phosphate assure une croissance optimale du micro-organisme, ce qui est prérequis pour une production efficace de biosurfactants [404].

5.5.2.1.3. Azote

La production de rhamnolipides est également influencée par des facteurs autres que les sources de carbone dans le milieu, et est affectée par la disponibilité de l'azote [298,405]. De nombreuses sources d'azote, dont le nitrate d'ammonium [406], le nitrate [407], le nitrate de sodium [408,409], et l'urée [36] sont les

meilleures sources pour la production de rhamnolipides par les souches de *Pseudomonas*. Mais, le choix de la source d'azote reste souvent dépendu de la composition du milieu et du micro-organisme producteur [394].

5.5.2.2. Paramètres environnementaux

Pour obtenir la meilleure production de biosurfactant à partir d'une souche de microorganisme choisie, il est décisif de définir les conditions de culture appropriées. Les facteurs importants à considérer incluent la température, le pH, l'apport en oxygène et la vitesse d'agitation [315,393].

5.5.2.2.1. Effet de la température

La température dans toute la croissance est également un facteur physique qui exige l'attention, car une petite différence peut de manière significative affecter la production des biosurfactants [394]. La température optimale pour la production de rhamnolipides se situe souvent entre 25 °C et 30 °C, mais cela peut varier selon la souche bactérienne utilisée [402,410].

5.5.2.2.2. Effet du pH

Le pH du milieu de culture peut influencer la production, avec des pH optimaux variant généralement entre 5,7 et 7,8 pour la plupart des souches productrices [271]. Les études indiquent que le rendement le plus élevé de rhamnolipide se produit dans une plage de pH de 6 à 6.8 [402].

5.5.2.2.3. Effet de l'agitation

Une aération et une agitation adéquates sont cruciales pour fournir l'oxygène nécessaire à la croissance bactérienne et à la production de rhamnolipides [347]. La modulation de la vitesse de rotation des flacons agités entre 50 et 200 tr/min pendant le cycle de croissance s'est révélée influencer la production de rhamnolipide [394]. Des vitesses de rotation plus élevées, entraînant une augmentation de l'aération, améliorent la production de rhamnolipides, résultant en des rendements plus élevés et une activité surfactant significative [411,412]. Plusieurs études indiquent qu'à environ 250 tr/min d'agitation, il y a une diminution de la production de rhamnolipides et de la biomasse cellulaire. Cette baisse est attribuée à la formation intense de mousse observée dans les flacons de culture agités à cette vitesse [410].

La mousse excessive entrave le transfert d'oxygène vers le milieu liquide, créant des conditions défavorables pour la production de rhamnolipides [315,413].

5.5.3. Production de biosurfactants à partir de substrats durables et économiques

Les coûts élevés de production restreignent leurs applications à l'échelle industrielle [269]. Des efforts ont été faits pour réduire les coûts, notamment en utilisant des déchets et sous-produits agro-industriels, des déchets industriels, des déchets huileux et à base de glycérol, et des déchets lignocellulosiques, comme substrats à faible coût [267,414,415].

5.5.3.1. Production de biosurfactants à partir de déchets agro-industriels et de leurs sous-produits

On étudie actuellement divers déchets de l'industrie, renouvelables et peu coûteux, pour évaluer leur potentiel en tant que substrats pour la production de biosurfactants. Parmi eux figurent les déchets agro-industriels et les résidus alimentaires [416,417]. Cette approche consistant à utiliser des déchets comme substrat présente un double avantage : elle contribue à accroître la rentabilité du processus tout en permettant une gestion efficace des déchets générés à un rythme sans précédent [418,419]. Cependant, outre l'aspect économique, des considérations telles que la stabilité, la forme et la quantité à utiliser sont également prises en compte lors du choix d'un substrat pour la production de biosurfactants [420,421].

Des espèces microbiennes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, et *Candida tropicalis*, sont également utilisées pour la production de biosurfactants à partir de déchets agro-industriels tels que la mélasse de dattes, les écorces d'orange, les déchets de manioc, le moût de maïs, la bagasse de canne à sucre, etc [331]. Encors, Les déchets produits lors du traitement des fruits et légumes, tels que les épluchures de pommes, oranges, bananes et carottes, peuvent être utilisés comme substrats pour la production de biosurfactants [346,422]. Meme, L'extraction d'amidon à partir de cultures telles que le blé, le riz, le manioc, les pommes de terre et d'autres génère d'importantes quantités d'eaux usées riches en amidon et en enveloppes. Ces eaux usées peuvent donc être utilisées comme matière première pour produire divers produits, dont des biosurfactants

[423,424]. La production de biosurfactants à partir de déchets agro-industriels offre divers avantages, tels qu'une rentabilité accrue, une disponibilité élargie de divers substrats, une production de substrats à grande échelle, des propriétés fonctionnelles préservées, des produits respectueux de l'environnement et non toxiques pour les microorganismes associés [415].

5.5.3.2. Production de biosurfactants à partir de déchets industriels

La demande industrielle de tensioactifs est en hausse constante, stimulée par l'intérêt croissant pour les biosurfactants, qui présentent des avantages environnementaux et de sécurité [415]. Une variété de déchets industriels, notamment ceux provenant de l'industrie laitière, des jus de fruits et du traitement des huiles, peut servir de substrat pour leur production [425]. Les déchets issus de la production et du traitement des huiles, comme les résidus de savon et les acides gras libres, sont particulièrement attrayants pour cette utilisation [142,384]. Les levures, en particulier l'espèce *Candida*, sont couramment utilisées pour produire des biosurfactants à partir de ces déchets industriels [426,427].

5.5.3.3. Production de biosurfactants à partir de déchets huileux et à base de glycérol

Les résidus de traitement alimentaire dans les industries incluent souvent des huiles de friture usées, qui présentent une concentration plus élevée en hydrocarbures polaires que les huiles fraîches [415]. Ces huiles contiennent principalement des monoglycérides, des diglycérides et des triglycérides, ainsi que des acides gras libres [428,429]. Des études ont montré que des microorganismes tels que *Pseudomonas aeruginosa* [9] et *Candida bombicola* peuvent produire des biosurfactants à partir d'huiles de friture usées, avec des exemples supplémentaires comme *Bacillus*, *Streptomyces*, et *Mucor* [415]. Aussi, le glycérol résiduel dérivé du biodiesel, comme substrat économique pour la production de biosurfactants, a été bien étudié [15,409,430,431].

5.5.3.4. Production de biosurfactants à partir de déchets lignocellulosiques

La lignocellulose, une riche source de carbone organique, est largement exploitée pour la production de biosurfactants [415]. Des études ont démontré que divers micro-organismes peuvent produire ces agents à partir de substrats

lignocellulosiques comme le marc de raisin distillé et hydrolysé. Des souches bactériennes telles que *Lactobacillus pentosus*, *Bacillus tequilensis*, et *Serratia nematodiphila* ont été utilisées avec succès à cet effet [432,433]. Toutefois, le coût de production des biosurfactants à partir de lignocellulose est accru en raison des prétraitements nécessaires pour rendre les résidus lignocellulosiques accessibles aux microbes [415]. Néanmoins, ces substrats demeurent une option rentable pour la production de biosurfactants, avec des souches telles que *Lactobacillus paracasei*, *Starmerella bombicola*, *C. bombicola*, et *Cutaneotrichosporon mucoïdes* [434,435].

5.6. Applications des rhamnolipides

Au fil du temps, les rhamnolipides ont acquis une pertinence croissante dans diverses industries, représentant une menace sérieuse pour les tensioactifs synthétiques. Avant d'aborder l'économie actuelle de la production de rhamnolipides, il est essentiel d'examiner les principales applications de ces composés qui les distinguent des autres biosurfactants [436]. Voici les applications majeures des rhamnolipides, qui répondent à une large gamme de besoins industriels, résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Les principales applications de rhamnolipides.

Industrie	Origine microbienne	Application et rôle de rhamnolipides	Références
Industrie pétrolière et environnement	<i>P. aeruginosa</i>	Récupération microbienne du pétrole MEOR.	[332]
	<i>P. aeruginosa</i>	Améliorer la solubilisation et la biodégradation des hydrocarbures polyaromatiques (HAPs) à désorption lente.	[437]
	<i>P. aeruginosa</i> S5	Dépollution <i>in situ</i> des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).	[438]
	<i>P. aeruginosa</i>	Dépollution des sols pollués par le zinc et le cadmium	[314]
	<i>P. aeruginosa</i> NAPH6	Remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteurs. Biodégradation du naphthalène, et du pétrole brut	[384]
Industrie alimentaire	<i>P. aeruginosa</i>	Dans les formulations de crème glacée et de pâtisserie, les rhamnolipides peuvent être utilisés pour contrôler la consistance, retarder le rassissement, solubiliser les arômes d'huiles, stabiliser les graisses et réduire les projections.	[439]
	<i>P. aeruginosa</i>	Agents anti biofilm sur les surfaces alimentaires, inhibition des biofilms chez <i>S. aureus</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>B. pumulus</i>	[440]
	<i>P. fluorescens</i>	Activité antiadhésive, inhibition de l'adhésion de quatre souches de <i>Listeria monocytogenes</i> .	[441]
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>P. aeruginosa</i>	Rhamnolipides en tant qu'émulsifiants, amélioration de la pâte	[442]
Industrie cosmétique, médicale et pharmaceutique	<i>P. aeruginosa</i> NAPH6	Activité curative sur l'emplacement de blessure.	[384]
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Traitements de la peau, y compris guérison des brûlures, traitement des rides et cicatrisation des plaies.	[436]

	<i>P. aeruginosa</i>	Thérapie cicatricielle, appliquée sur un modèle d'oreille de lapin.	[443]
	<i>P. aeruginosa</i> W10	Inhibition de la formation de biofilm et perturbation du bio encrassement sur les surfaces en acier inoxydable.	[350]
	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Efficacité antimicrobienne et anti biofilm contre les agents pathogènes liés à l'hygiène bucco-dentaire.	[349]
Nanotechnologie	<i>P. aeruginosa</i> UCP0992	Faciliter la stabilisation des nanoparticules dans les microémulsions.	[444]
	Commercial	Améliorer la biodisponibilité et la délivrance de médicaments.	[445]
	Commercial	Combinaison de rhamnolipide et de chitosane dans des nanoparticules augmente leur efficacité antimicrobienne, et une meilleure délivrance des composés aux cibles moléculaires dans les bactéries Gram-positives.	[446]
Agriculture	<i>Burkholderia cenocepacia</i> BSP3	Solubilité des pesticides.	[339]
	<i>Acinetobacter</i> sp. ACMS25	Efficacité du biocontrôle contre <i>Xanthomonas oryzae</i> responsable de la maladie du mildiou du riz.	[447]
	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibition de la croissance mycélienne fongique contre le phytopathogène <i>Phytophthora sojae</i> et de la lyse de leurs zoospores	[448]
	<i>P. aeruginosa</i> KVD-HM52	Activité antifongique contre la maladie du flétrissement <i>Fusarium oxysporum</i> des plants de tomates.	[449]
	<i>P. aeruginosa</i> SS14	Activité antifongique contre <i>Fusarium verticillioides</i> , pour lutter contre la pourriture des tiges et des épis du maïs.	[450]

III. Matériel et Méthodes

L'objectif général de cette recherche consiste à étudier l'effet des bactéries productrices de biosurfactants dans la bioremédiation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à :

- ✚ L'isolement et la caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries productrices de biosurfactants. Une attention particulière est portée aux *Pseudomonas* étant donné la versatilité métabolique caractérisant ce genre.
- ✚ L'évaluation du potentiel synthétique des biosurfactants en utilisant différents substrats ainsi qu'une caractérisation structurale de ces biopolymères ;
- ✚ Mettre en évidence les potentialités bio dégradatives des hydrocarbures par les souches isolées ;
- ✚ L'application des biosurfactants *in vitro* comme étant des molécules de remobilisation des hydrocarbures, et de lutte antimicrobienne.

1. Lieu et période des expérimentations

Ce travail a été réalisé en février 2020 jusqu'au décembre 2023, au sein du *Laboratoire de Géo Environnement et Développement des Espaces, Equipe Biotechnologie Microbienne et Environnement (BME)* (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-Université de Mustapha Stambouli de Mascara). Plusieurs investigations complémentaires ont été réalisées au niveau du *Laboratoire de Bioressources Naturelles* (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Hassiba Benbouali de Chlef), et le *Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux* (Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie).

2. Produits chimiques et composition des milieux

2.1. Milieux de culture

Ils sont consignés dans le tableau 15 (Annexe 1). Tous les milieux ont été préparés avec un pH final de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C et autoclavés à 121 °C pendant 20 minutes.

2.2. Hydrocarbures, huiles et autres

Les hydrocarbures aliphatiques (incluant l'octane, le pentadécane et le décane), les composés mono-aromatiques ((BTEX) tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes : ortho-, méta- et para-), ainsi que les HAPs - spécifiquement le naphthalène (NAPH), le phénanthrène (PHE), le fluoranthène (FLUA) et le benzo[a]pyrène (BaP) - ont été sourcés chez Sigma-Aldrich avec une pureté de 98 à 99 %.

Les composés aliphatiques et les aromatiques ont été filtrés à une porosité de 0,45 µm de Millipore (Ref. SP2MF047CA045S), tandis que les HAPs ont été autoclavés. Le pétrole brut requis a été obtenu auprès du champ pétrolifère de Hassi Messaoud, et de Thyna Petroleum Services situé à Sfax, en Tunisie, et a également été autoclavé à 121 °C pendant 20 minutes. L'huile d'olive provenait des marchés locaux cependant l'huile de friture usée et les résidus d'huile de thon en conserve ont été recueillis auprès de sources locales probablement (Restaurants et des cuisines). Ces huiles ont été stérilisées à l'aide de filtre seringue en cellulose, M.E, 0,45µm, 25mm (Ref. TR-200104).

Les hydrocarbures et les huiles susmentionnés ont été additionnés aux milieux de culture à une concentration de 1% (v/v). Les HAPs sous forme solide ont été solubilisés dans de l'acétate d'éthyle à 100 g L⁻¹, puis incorporés aux milieux de culture à la concentration finale désirée (200 mg L⁻¹).

3. Zone d'étude

3.1. Choix de la zone d'étude

Dans le cadre de notre enquête sur ces zones polluées, nous nous sommes dirigés vers les deux stations d'épuration des eaux usées de la ville de Mascara et de la ville de Chlef. Pour la raffinerie pétrolière, notre choix était pour Hassi Berkine, wilaya d'Ouargla.

3.2. Localisation géographique et caractéristique

Les zones suscitées se trouvent dans la région de Mascara, Chlef, et Ouargla de l'Algérie. Les coordonnées géographiques du site de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Mascara (Fig. 14a) sont situées à une latitude de



Figure 14. Localisation géographique des sites d'échantillonnage : Station d'épuration des eaux usées de la ville de Mascara (a), Station d'épuration des eaux usées de la ville de Chlef (b), et la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine (c).

35°16'0.70''N et à une longitude de 0° 8'53.05''E. A une latitude de 36°10'10''N et à une longitude de 1°18'45''E pour la station d'épuration des eaux usées de la ville de Chlef (Fig. 14b). La Fig. 14c fournit une représentation visuelle de l'emplacement précis du site de la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine (latitude : 31°44'32''N ; longitude : 6°02'33''E).

3.3. Echantillonnage

Les sols ont été échantillonnés sur les sites susmentionnés en 2020/2021 d'une façon non systématique. L'échantillonnage des sols a été réalisé avec une méthode rigoureuse pour assurer la représentativité des échantillons prélevés. Les prélèvements ont été réalisés selon la méthode de Pepper & Gerba [451]. Les échantillons de sol (50 g) ont été prélevés à partir de la surface et des profondeurs (1-10 cm) et collectés dans des sachets avec fil de fermeture 60 ml – stérile (Ref. 039.21.001). Les échantillons ont été par la suite transportés au laboratoire +4 °C dans un délai de 24 h. Par ailleurs, les échantillons de sol provenant des stations d'épuration des eaux usées ont été collectés de différents bassins (déshuileur, bassin de dessablage, bassin de décantation, et bassin des boues activées) avec les mêmes conditions de prélèvement microbiologique.

4. Isolement des bactéries productrices de biosurfactants

Pour une bonne sélection des bactéries productrices de biosurfactants et aptes à dégrader les HAPs, nous avons utilisé la méthode d'enrichissement, qui consiste à mélanger 1 g de chaque échantillon avec 10 ml d'eau physiologique et vortexer pendant 10 minutes pour mener par la suite une série de dilution (10^{-1} jusqu'à 10^{-6}). Une gélose LB a été inoculée avec 100 μ L des dilutions 10^{-3} à 10^{-6} . L'incubation a été réalisée à 30 °C pendant 24h. Les cultures bactériennes ont été étalées et incubées à 42 °C pendant 24 h sur gélose au cétrimide pour déceler les pigments fluorescents bleu-vert ou jaune-vert caractérisant les *Pseudomonas* [332,452].

5. Caractérisation des *Pseudomonas*

Selon les schémas d'identification dichotomique des principaux Gram négatifs décrits par Palleroni [453] le diagnostic a été réalisé en sélectionnant un petit nombre de caractères significatifs permettant une identification plus précise du genre *Pseudomonas*.

5.1. Caractérisation phénotypique

L'identification des isolats était établie en se basant sur des schémas d'identifications dichotomiques (tests culturels ou macroscopique et microscopique) selon Stanier et al. [454], Palleroni, [453], et Bossis et al. [455].

Selon Palleroni [453], l'aspect fluorescent des colonies sur les milieux chromogènes fluorescent est caractéristique d'un *Pseudomonas fluorescens*. La mesure de l'émission de la fluorescence a été réalisée en exposant ces colonies sous une lampe UV ($\lambda = 250-360$ nm). Trois milieux de culture utilisés : Pseudomonas Agar F (Ref. 610309) ; Pseudomonas Agar F (Ref. 610310) et Cetrimide Agar (Ref. 610041).

5.2. Caractérisation biochimique

Avant d'effectuer l'identification biochimique à l'aide des galeries API (bioMérieux®), il est indispensable d'explorer la production de catalase, cytochrome oxydase, nitrate réductase, l'étude du métabolisme glucidique (caractère oxydatif). Ils permettent de distinguer des groupes bactériens parmi les bacilles à Gram négatif, la production d'une cytochrome oxydase permet de différencier les entérobactéries de *P. aeruginosa* [455].

La galerie API 20NE (bioMérieux®) a été conçue pour identifier les bacilles à gram négatifs (BGN) non fastidieux tel est le cas pour le genre des *Pseudomonas*. Avec les 20 substrats déshydratés (les nitrates, l'urée, l'esculine, la gélatine, le L-tryptophane, etc), il sera facile de confirmer cette caractérisation.

Les tests ont été réalisés selon les instructions du fabricant Biomerieux, France (voir Annexe), et les résultats ont été interprétés à l'aide du logiciel UPBM (<https://lab.upbm.org/identifieur/galerie.php>).

6. Caractérisation physiologique

6.1. Test de croissance à différentes températures

Ce test est important car il permet de distinguer les souches mésophiles des souches thermophiles, il est réalisé en bouillon LB. La densité optique (DO) à 580 nm a été mesurée afin de confirmer la tolérance des souches après 24 h d'incubation à 4 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C et 45 °C.

6.2. Croissance en présence de milieux avec différents pH

L'habilité des souches isolés à croître dans milieu avec différents pH est testé sur bouillon LB à pH 2, 4, 6, 8, 10, et 12 pendant 24 h. Après le temps d'incubation,

la DO à 580 nm a été mesurée afin de confirmer la tolérance des souches aux différents pH.

6.3. Croissance en présence de diverses concentrations de Na Cl

Sur des bouillons LB hypersalés contenant du Na Cl à concentration de 2, 4, 6, 8, 10, et 12% nous avons cultivé les souches isolées et les incubées à des températures adéquates pendant 24 h. La DO à 580 nm a été mesurée afin de confirmer la tolérance des souches.

7. Conservation des isolats purifiés

Pour la suite des expériences un stock deux conservations a eu lieu, à court terme et à long terme. La première consistait à inoculer en stries le milieu LB solide incliné avec les isolats purifiés, incubé de nouveau à 37 °C/ 48 h. Après croissance les tubes ont été remis aux réfrigérateurs pour une conservation à 4 °C.

Pour la conservation à long terme ou congélation, à partir des précultures de 18 h (milieu liquide), les cellules sont récupérées par centrifugation à 6000 tours par minute pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, on ajoute le milieu de culture de conservation sur le culot. La congélation des suspensions bactériennes en phase exponentielle était faite à -80 °C sur gélose LB en Eppendorf contenant 40% de glycérol (Ref. 15523-1L-R).

8. Criblage préliminaire des souches productrices de biosurfactants

Pour la sélection des souches productrices de BSs, une production de BSs a été réalisée en utilisant du bouillon nutritif enrichi avec 1% (v/v) d'huile d'olive comme source de carbone. Les flacons de 250 mL contenant 50 mL de bouillon nutritif enrichi d'huile d'olive ont été inoculés avec une proportion d'inoculum correspondant $1,5 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹ des isolats bactériens et incubés à 30 °C dans un agitateur orbital à 150 tr/min pendant 48 h.

8.1. Méthodes qualitatives

8.1.1. Test hémolytique (TH)

Le criblage hémolytique a été créé par Mulligan et *al.* [456] et se base sur la lyse des érythrocytes sanguins. Des boîtes de Petri stériles contenant de la gélose au

sang ont été inoculées par les souches testées et incubées à 37 °C pendant 48 à 72 h. L'apparition des colonies transparentes et incolores signifie un résultat positif pour les souches productrices de biosurfactant.

8.1.2. Méthode de la gélose au CTAB

La méthode de Siegmund et Wagner [457] permet d'identifier les producteurs de biosurfactants anioniques (rhamnolipides). La gélose CTAB (cétyltriméthylammonium) est inoculée avec les souches bactériennes criblées. L'obtention des halos bleu foncé entourant les colonies après 5 à 7 jours d'incubation à 37 °C indique un résultat positif. Ce dernier est complété par une réfrigération à 4 °C pendant 24 heures des boîtes de CTAB. Ceci permettra un développement plus important de la couleur, indiquant ainsi la production de rhamnolipides.

8.1.3. Test d'effondrement de goutte (TEG)

Cet essai est réalisé dans une microplaque à 96 puits, recouverte d'une fine couche de pétrole. Ensuite, un surnageant de culture de 5 µL est ajouté au centre de chaque puit et examiné après 1 min [458].

8.1.4. Méthode de recouvrement à base d'hydrocarbures sur gélose (MRGH)

Il s'agit d'un test qualitatif pour la détection des producteurs de biosurfactants. Dans cette méthode, une boîte contenant de gélose Luria Bertani recouverte d'hydrocarbures est inoculée avec une culture microbienne et incubée pendant 72 h à 37 °C. Les colonies entourées de halos émulsifiés sont considérées comme positives [459].

8.1.5. Test de déplacement d'huile (TDH)

Cette méthode a été développée par Morikawa *et al.* [460]. Dans une boîte de Pétri, une fine couche d'huile ou de pétrole a été formée en étalant 20 µl de pétrole brut sur 30 mL d'eau distillée. Ensuite, le surnageant à tester (10 µL) est placé au centre de la couche d'huile. Dans cet essai, un bouillon nutritif stérile a été utilisé comme contrôle négatif. Le déplacement d'huile et la formation d'une zone claire

confirment la présence de biosurfactant dans le surnageant de culture. Le diamètre de cette zone claire est lié à l'activité des biosurfactants [461].

8.2. Méthode quantitative

8.2.1. Indice d'émulsification (E24)

L'indice d'émulsification est un test quantitatif permettant d'analyser les biosurfactants [462]. Dans un tube à essai gradué, 2 mL de kérosène ont été ajoutés à 2 mL du surnageant testé. Après 2 minutes de vortex, le mélange a été laissé dans le tube pendant 24 heures sans être déplacé. Ce test a été réalisé en utilisant 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS) comme contrôle positif (tensioactif chimique) et du bouillon nutritif comme contrôle négatif. La hauteur de la couche émulsifiée dans le tube à essai est mesurée pour calculer l'indice d'émulsification comme suit :

$$\text{Indice d'émulsification, } E24 (\%) = \frac{\text{Hauteur de la couche d'émulsion}}{\text{Hauteur de la solution totale}} \times 100$$

8.2.2. Mesure de la tension superficielle (TS)

La tension de surface a été mesurée selon le protocole décrit par Zajic et *al.* 1983 [463,464] avec une légère modification et qui consistait à centrifuger les cultures bactériennes à 15 000 tr / min pendant 15 min et chaque surnageant a été filtré sur filtre Whatman pour éliminer toutes les cellules. Le TS (mN/m) a été mesurée par la méthode de l'anneau de Du Nouy à la température ambiante avec un tensiomètre digital K12–Kruss Tensiometer, Hamburg, Germany) sur 30 ml des surnageants filtrés. La tension de l'eau (72 mN/m) a été prise comme témoin. Dans des conditions d'asepsie, la mesure a été répétée trois fois et l'anneau de platine a été nettoyé à l'alcool avant chaque mesure.

9. Etude phylogénétique

9.1. Extraction d'ADN

L'ADN des bactéries a été extrait par l'utilisation du Kit Nucleospin de Macherey-Nagel en suivant le mode opératoire d'extraction du fournisseur du kit (Macherey-Nagel Germany). Les ADN extraits ont été dosés au nano drop 2000 pour la détermination de leurs quantités et leurs qualités en regardant le ratio du rapport de longueurs d'onde 260/280 et aussi 260 /230. Les réactifs, les

concentrations et les volumes utilisés ainsi que la programmation de la PCR sont exposés dans les tableaux 3 et 4, respectivement.

9.2. Amplification de l'ADN 16S

L'amplification a été réalisée par l'utilisation du thermocycleur P100 de Biorad (Biorad, USA). Les amorces universelles 16S sont :

27f (forward) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R (Reverse) : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Tableau 3 : Mélange réactionnel de différentes réactions PCR.

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			14,1 µL
Tampon de Taq Promega	5X	1X	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,5 µL
DNTP	25 mM	0,2 mM	0,2 µL
Amorce 27F	10 µM	0,4	1 µL
Amorce 1492R	10 µM	0,4	1 µL
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2 µL
ADN génomique			2 µL
Volume final			25 µL

Tableau 4 : Programme utilisé pour la réaction de la PCR.

Dénaturation initiale	95 °C pendant 5min
35 cycles	
Dénaturation	95 °C pendant 30s
Hybridation	55 °C pendant 30s
Élongation	72 °C pendant 45s
Elongation finale	72 °C pendant 7min
Stockage avant révélation	-20 °C jusqu'à utilisation

Les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% par dépôt de 10 µL de produit de PCR suivi d'une coloration dans

un bain de bromure d'éthidium ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Après migration, l'ADN est visualisé et photographié sous UV.

9.3. Purification des produit PCR

Les produits PCR ont été purifiés par le kit Clean up de Macherey-Nagel (MN., Germany) suivant le protocole décrit par le fournisseur.

9.4. Séquençage

Les produits PCR isolés et purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger [465] en utilisant le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems et par l'utilisation des amorces qui ont servie pour l'amplification PCR.

Les séquences obtenues sont analysées et nettoyées par l'utilisation du logiciel CHROMAS PRO. Les séquences finales sont alors comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI pour l'identification des isolats étudiées en se basant sur le % homologie avec les souches de références. Ensuite, les séquences ont été analysées phylogénétiquement à l'aide du programme MEGA11.0.10 (méthode de l'algorithme-Neighbor Joining) pour la construction de l'arbre phylogénétique [466].

10. Biosurfactants produits par les souches sélectionnées

10.1. Tests de production de biosurfactants sur différentes sources de carbone

Des cultures sur différents substrats, utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie, en présence du 50 mL de milieu bouillon nutritif pour la souche BSP4, et en présence du 50 mL de milieu de base pour la souche BSP9, à 37 °C et à 180 tr/min, sont suivis par mesure de la densité optique à 600 nm et par détermination de la tension de surface. Les expériences ont été réalisées avec une proportion d'inoculum correspond à $1,5 \cdot 10^8$ UFC mL^{-1} . Les substrats testés sont les suivants : huile d'olive, huile de friture usée, glycérol, kérosène, huile de moteur usée, pétrole brut, et résidus d'huile de thon en conserve.

10.2. Détermination de la tension de surface (TS)

Pour évaluer la production de BSs, la réduction de la tension superficielle (TS) est utilisée comme premier indicateur [467]. À cet effet, un tensiomètre numérique (GIBERTINI TSD 132389, Italie) équipé d'un élévateur manuel pour positionner le cristallisateur a été employé. La TS est déterminée en mesurant la valeur maximale de la force au moment du contact entre l'échantillon et la lamelle, exprimée en mN/m. De 10 à 20 millilitres de la culture bactérienne ont été prélevés puis centrifugés à 4000 tr/min pendant 20 minutes. Le surnageant de la culture est ensuite filtré à travers un papier filtre standard de type RS (grammage de 77g/m² et porosité de 8-11 µm) avant de procéder à la mesure de la tension superficielle.

10.3. Test de déplacement d'huile (TDH)

Ce test repose principalement sur la capacité du BS à modifier l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du BS peut déplacer l'huile. Pour réaliser le test, un volume de 100 µL de pétrole brut est déposé à la surface de 20 mL d'eau distillée contenue dans une boîte de Petri (90 mm de diamètre), formant ainsi une fine couche d'huile. Ensuite, 10 µL de la solution de l'échantillon est délicatement déposé au centre, provoquant le déplacement de l'huile et la formation d'un halo clair. Le diamètre de ce halo est ensuite mesuré [468].

10.4. Récupération de biosurfactants

Après 48 h d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10,000 tr/min pendant 15 min pour éliminer les cellules bactériennes. La précipitation du surnageant a été réalisée en ajoutant de l'HCl 6 N jusqu'à ce que le pH atteigne 2,0 et incubée à 4 °C pendant une nuit. Pour obtenir le BS brut, une centrifugation à 10,000 tr/min pendant 15 min a été employée pour collecter le précipité. Le BS brut a été extrait en utilisant de l'acétate d'éthyle comme solvant. Après une agitation vigoureuse à l'aide d'une ampoule à décanter, le mélange a été laissé reposer pour permettre la séparation en phases aqueuse et organique pendant 15 min. Un ballon à fond rond couplé à un évaporateur a été utilisé pour retirer le solvant de la phase organique à 45 °C, jusqu'à l'obtention d'un résidu visqueux de couleur brun jaunâtre, puis stocké à 4 °C pour les études ultérieures [9,142].

10.5. Détermination de la CMC

Pour mesurer la CMC, plusieurs techniques peuvent être employées, incluant la mesure de la conductivité électrique, l'analyse de la tension de surface, l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence et la calorimétrie différentielle à balayage, chacune permettant d'évaluer les changements de propriétés physico-chimiques de la solution au voisinage de la CMC.

Dans ce contexte, la CMC a été déterminée en mesurant les tensions de surface des dilutions des biosurfactants bruts Rhl-BSP4 (synthétisés sur le milieu BN enrichi en huile de friture usée (1%, v/v)), et BS-BSP9 (produit sur le milieu LB), à partir d'une solution de BSs de 1 g L⁻¹ fournie dans de l'eau distillée, la CMC a été étudiée en surveillant la tension de surface de dilutions successives de BSs isolés jusqu'à ce qu'une valeur constante soit atteinte. La CMC est la concentration minimale de biosurfactant qui entraîne la réduction maximale de la tension de surface. C'est à cette concentration que les micelles commencent à se former [9,142].

10.6. Test de la stabilité des biosurfactants

Des études de stabilité des BSs ont été effectuées en utilisant un volume de 20 mL de surnageants des cultures BSP4 (cultivée sur milieu BN enrichi en huile de friture usée (1 %, v/v)) et BSP9 (cultivée sur milieu LB), après 2 jours d'incubation.

La stabilité des BSs a été évaluée en examinant les effets de la température, du pH et de la concentration en chlorure de sodium. L'effet du pH a été exploré en modifiant les niveaux de pH du surnageant à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 en utilisant de l'HCl (6 M) ou de NaOH (10 M). Pour vérifier la stabilité à la température, l'BS a été exposée à des températures de -80, -20, 4, 30, et 60 °C pendant 24 heures, à 105 °C pendant une heure et à 120 °C pendant 20 minutes. L'influence de la concentration en Na Cl a été étudiée en incorporant des quantités variables de Na Cl (2, 4, 6, 8, 10, et 12% p/v). L'efficacité de chaque traitement a été mesurée par analyse de la tension de surface et de l'activité de déplacement d'huile, immédiatement pour les tests de pH et de la salinité et après les incubations pour les températures allant de -80 à 60 °C, après une heure pour la température à 105 °C, et après un cycle d'autoclavage (20 min) pour la température 121 °C [9,142].

11. Activité antimicrobienne de biosurfactants

11.1. Activité antimicrobienne sur milieu solide

L'activité antimicrobienne de BSs, produits par la souche BSP4, a été testée *vis-à-vis* *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 et *C. albicans* ATCC 10231 (fournies par le Laboratoire de Bioressources Naturelles). Les précultures des souches pathogènes ont été ajustées à 0,5 Mc. Ferland à 600 nm et ensemencées sur milieu MH. L'extrait brut a été dilué dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) pour obtenir deux concentrations de 25 et 50%. 100 µL de l'extrait brut à 100%, 50% et 25% a été déposé dans les puits sur les boîtes, le DMSO, l'ampicilline (10 µg) et la gentamicine (120 µg) ont été utilisés comme témoins négatif et positif, respectivement. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h pour mesurer le diamètre la zone d'inhibition.

Par ailleurs, L'efficacité antimicrobienne de BS, produits par la souche BSP9, a été évaluée contre divers agents pathogènes, notamment *B. cereus* ATCC 14579, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *C. albicans* ATCC 10231. Les cultures de ces agents pathogènes ont été normalisées selon un standard McFarland de 0,5 à 600 nm et appliquées sur milieu MH. L'extrait de BS a été mélangé avec du DMSO (sulfoxyde de diméthyle) pour assurer sa dispersion homogène sur le milieu, comme décrit par Mesbaiah et *al.* [469], ce qui a donné trois concentrations distinctes : 50, 25 et 12,5 mg mL⁻¹. Un volume de 100 µL de chaque concentration préparée a été déposé dans des puits sur la gélose, les cultures ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour observer les zones d'inhibition.

11.2. Détermination de la CMI de BSs

Les CMI (concentrations minimales inhibitrices) de l'extrait de BS, produits par les souches BSP4 et BSP9, ont été détectées contre *B. cereus* ATCC 14579, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *C. albicans* ATCC 10231 en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide (plaques de 96 puits) développée par Elshikh et *al.* [470] dans le bouillon Mueller Hinton avec quelques modifications dans la détection de la viabilité cellulaire bactérienne. Cette dernière a été achevée en ajoutant 20 µL d'une solution contenant du colorant au tétrazolium de triphénylchlorure (5 mg mL⁻¹).

11.2.1. Préparation d'un inoculum standardisé

Les inocula ont été préparés conformément à la recommandation du CSLI, où la valeur de l' DO_{600} était ajustée à l'équivalent de 10^8 UFC mL^{-1} , ce qui a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage pour chaque micro-organisme. Une courbe d'étalonnage a été établie pour chaque micro-organisme.

11.2.2. Préparation de plaques à 96 puits

Les BSs ont été dissous dans du bouillon Muller Hinton (BMH) à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale du test, avec un ajustement du pH à 7. Ensuite, 100 μL du bouillon de BS/BMH ont été ajoutés à chaque puits de la colonne 1, tandis que les colonnes 2 à 10 contenaient 50 μL de bouillon MH seul. La colonne 11 contenait 100 μL de l'inoculum standardisé dilué, et la colonne 12 contenait 100 μL du bouillon de milieu (comme témoin). Une micropipette a ensuite été utilisée pour transférer et mélanger les BSs des colonnes 1 à 10, un volume de 50 μL de BS a été incorporé à chaque puit. Les différentes concentrations testées de BSs ont été obtenues par des dilutions sérielles doubles des colonnes 1 à 10, allant de 50 à $0,01$ $mg\ mL^{-1}$ [470].

11.2.3. Détermination de la CMB de BSs

Après évaluation de la CMI, les cultures provenant des puits ne montrant pas de croissance ont été transférées sur un milieu MH gélosé, qui ont ensuite été incubées à $37\ ^\circ C$ pendant 24 heures, pour déterminer la concentration bactéricide minimale (CBM) de BS.

12. Test de sensibilité aux antibiotiques

Ce test est utilisé pour étudier la sensibilité bactérienne aux antibiotiques, il est réalisé en milieu MH solide, Une série de tests a été faite pour caractériser les souches de *P. aeruginosa* productrices de BSs selon leurs profils de résistance *vis-à-vis* de 15 antibiotiques. L'incubation était faite à $35 \pm 2\ ^\circ C$, aérobiose, 20 ± 4 h selon le protocole du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (2024). Les ATB utilisés sont fournis par Sigma Aldrich.

12.1. Préparation d'inoculum bactérien

Une suspension bactérienne est réalisée en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ $1,5 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹ pour *P. aeruginosa*. Les surfaces des géloses MH sont écouvillonnées par une suspension bactérienne de 0,5 Macfarland (correspond $1,5 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹), sur lesquelles sont disposés les disques d'antibiotiques. Il est impératif de répartir l'inoculum de façon homogène sur toute la surface de la gélose en prenant soin de ne pas laisser d'espace entre les stries.

12.2. Application des disques d'antibiotiques

Après séchage de gélose, les disques d'antibiotiques sont déposés stérilement, à la surface du milieu (5 ou 6 antibiotiques par boîte de Pétri). Afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition nous avons respecté une distance de 15 mm entre le bord de la boîte et les disques périphériques puis une distance de 25 mm entre deux disques.

12.3. Pré-diffusion et incubation

Un délai de 15 à 30 min à température ambiante a été observé pour permettre la pré-diffusion des antibiotiques. Ensuite les boîtes, couvercle en bas, ont été portées à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition apparue.

12.4. Lecture des résultats

La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'un pied à coulisse selon les diamètres discriminants fixés par le CLSI (2023).

13. Identification structurale des biosurfactants

13.1. Analyse par spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR a été réalisée pour caractériser les BSs produits en utilisant un spectrophotomètre Bruker Alpha en mode de transmission KBr. Les

spectres FTIR ont été enregistrés dans la plage de 500 à 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1}

13.2. Analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La composition chimique des BSs bruts a été aussi analysée en utilisant la RMN ^{13}C et la RMN ^1H . Le BS testé a été dissous dans du chloroforme deutéré et les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide d'un RMN 400 MHz, Bruker, Ascend 400, à 25 °C.

14. Expériences de biodégradation

14.1. Tolérance des souches productrices de biosurfactants aux divers hydrocarbures

14.1.1. Tolérance de la souche BSP4

Une étude de tolérance de la souche BSP4 a été réalisée en appliquant le milieu Bushnell Haas enrichi en naphthalène et en pétrole brut comme seule source de carbone. Le naphthalène a été dissous dans de l'acétone à 100 g L^{-1} puis incorporé dans le milieu BH à la concentration finale souhaitée (200 mg L^{-1}) dans des flacons de culture de 100 mL, et 1% (v/v) de pétrole brut a été ajouté à 50 mL de milieu BH. Les cultures en flacons inoculées (une proportion d'inoculum correspond 1,5 10^8 UFC mL^{-1}) ont été incubées à 30 °C sous agitation orbitale à 150 tr/min pendant 7 jours pour les cultures inoculées contenant du naphthalène et 21 jours pour les cultures inoculées contenant du pétrole brut. Des cultures en flacons similaires contenant les mêmes concentrations de naphthalène et de pétrole brut et sans inoculation bactérienne ont été incubées dans les mêmes conditions pour servir de témoins abiotiques. La densité optique (OD) à 600 nm a été évaluée pour confirmer la tolérance de la souche BSP4 au naphthalène et au pétrole brut [9].

14.1.2. Tolérance de la souche BSP9

Le potentiel de croissance de la souche BSP9 sur milieu de base enrichi avec différents substrats, servant de seules sources de carbone et d'énergie, a été exploré. Elle a été testée contre des composés non aromatiques connus sous le nom de BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et les xylènes : p-, m- et o-) à une concentration de 1% (v/v). De plus, le potentiel de la souche à métaboliser divers

hydrocarbures et huiles a été évalué, y compris l'octane (1%, v/v), le pentadécane (1%, v/v), le décane (1%, v/v), le naphthalène (200 mg L⁻¹), le phénanthrène (200 mg L⁻¹), le fluoranthène (200 mg L⁻¹), le benzo[a]pyrène (200 mg L⁻¹), le pétrole brut (1%, v/v), l'huile d'olive (1%, v/v), l'huile de friture usée (1%, v/v), et les résidus d'huile de thon en conserve (1%, v/v). Une indication positive de croissance a été identifiée par une augmentation de la densité optique (DO) à 600 nm dans les cultures contenant ces substrats, par rapport à une culture témoin sans substrats. Pour ces expériences, 50 mL d'un milieu de base ont été inoculés avec une pré-culture de la souche correspond 1,5 10⁸ UFC mL⁻¹, incubée toute une nuit, puis incubés à 37 °C avec agitation à 150 tr/min [142].

14.2. Méthodes analytiques : chromatographiques et spectroscopiques

14.2.1. Extraction des hydrocarbures

Les cultures bactériennes contenant la source de carbone à dégrader (HAP ou pétrole brut) ainsi que leurs témoins abiotiques sont soumises à des extractions à l'acétate d'éthyle (AE) ou au dichlorométhane (DCM), répétées trois fois (v/v), à différents moments d'incubation. Initialement, 50 mL de culture sont récupérés dans une ampoule à décanter de 250 mL, auxquels 50 mL de solvant seront ajoutés. Après agitation vigoureuse, le mélange est laissé en décantation pendant 15 minutes. La phase organique est ensuite récupérée dans un ballon de 500 mL et soumise à un séchage par évaporation rotative (Rotavap) à 45 °C. Les hydrocarbures résiduels sont dissous dans le solvant approprié et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) ou par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID).

14.2.2. Chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une méthode d'analyse qui associe les capacités de séparation de la chromatographie en phase gazeuse à la capacité de détection et d'identification des composés basée sur leur rapport masse/charge par spectrométrie de masse. L'équipement utilisé comprend un chromatographe (Agilent Technologies 6890N/5975) équipé d'une colonne HP-5 (siloxane de méthyl phényl, 5%) (longueur

: 30 m ; diamètre interne : 0,25 cm ; épaisseur du film : 0,25 µm). Le gaz porteur est de l'hélium, utilisé à un débit de 1 mL/min, et la température de l'injecteur est fixée à 250 °C. Le programme de gradient de température est le suivant : 2 minutes à 70 °C, suivi d'une augmentation de la température jusqu'à 230 °C à raison de 20 °C/min. Ensuite, la température est augmentée de 230 à 300 °C pendant 2 minutes, puis stabilisée à 300 °C pendant 10 minutes [9,25].

Les composants ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse à ceux de la base de données spectrale de masse NIST [9]. Selon Varjani et *al.* [471], le taux de biodégradation (%) a été calculé comme suit :

$$\text{Taux de biodégradation (\%)} = 100 - (T_{pa} \times 100/T_{pac}),$$

T_{pa} : l'aire totale des pics de l'échantillon

T_{pac} : l'aire totale des pics du contrôle abiotique, ou bien l'aire totale des pics de l'échantillon à T₀.

14.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) est une méthode d'analyse largement utilisée dans les domaines de la pétrochimie, de la pharmacie et du gaz naturel. Un détecteur à ionisation de flamme (FID) utilise généralement une flamme d'hydrogène/air à travers laquelle les échantillons sont injectés pour être oxydés, produisant ainsi des ions chargés électriquement. Ces ions sont collectés pour générer un signal électrique mesurable. L'équipement utilisé comprend un chromatographe (modèle Agilent Technology 6890 N) et une colonne HP-5 (longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,25 µm). Le gaz porteur utilisé est de l'hélium, délivré à un débit de 1 mL/min. La température de l'injecteur est initialement réglée à 50 °C pendant 10 minutes, puis augmentée à 250 °C à un taux de 15 °C/min, avant d'atteindre 300 °C et de se stabiliser à cette température pendant 5 minutes [9,25].

Le taux de biodégradation (%) a été calculé selon la méthode de Varjani et *al.* [471], comme décrit ci-dessus.

15. Remobilisation des hydrocarbures par les biosurfactants

Le BS Rhl-PSP4, produit à partir d'huile de friture usée par la souche BSP4, a été appliqué à la remobilisation des hydrocarbures. Un échantillon de 100 g de sol a été prélevé du jardin du département de biologie (UHBC), puis contaminé avec 20 mL chacun d'huile moteur usagée et de pétrole brut. Par la suite, 10 g de sol pollué ont été placés dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL pour subir différents traitements. Ces traitements comprenaient l'ajout de 20 mL d'eau distillée (à titre de contrôle), 20 mL de Rhl-BSP4 dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 0,035 % (p/v), 20 mL de surnageants obtenus à partir de la souche BSP4 cultivée sur huile de friture usagée, et 20 mL d'une solution contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS) à une concentration de 0,2304% (v/v). Le sol traité a été incubé pendant une nuit à 30 °C et 150 tr/min, suivi d'une centrifugation pendant 20 minutes à 6 000 tr/min pour séparer les particules de sol du surnageant liquide. Une extraction à l'hexane a été réalisée deux fois (v/v). La méthode gravimétrique a été suivie pour évaluer la quantification des hydrocarbures extraits du sol traité selon ce qui a été mentionné par Hentati et *al.* [384].

16. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 9.0. La signification des tests statistiques a été déterminée par le test ANOVA à un facteur avec comparaisons multiples de Tukey. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

L'analyse entreprise vise d'une part à évaluer la capacité des souches isolées à produire des biosurfactants possédant également une activité antimicrobienne. D'autre part à surveiller la croissance des souches sur différents hydrocarbures pour une prometteuse remobilisation.

IV. Résultats et Discussion

1. Caractérisation des souches isolées

1.1. Caractérisation morphologique

1.1.1. Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique des cultures sur différents milieux a pour objectif de caractériser la taille, la forme, l'aspect ainsi que la couleur des colonies. Les colonies sont apparues souvent de couleur verte en raison de la production de pigments tels que la pyocyanine (bleu-vert) et la pyoverdine (vert fluorescent) (Fig. 15). Elles sont généralement lisses, brillantes, souvent légèrement convexes, et ayant un bord irrégulier (Fig. 15).

Toutes les souches appartiennent à *Pseudomonas* puisque la gélose au cétrimide est considérée comme un milieu sélectif pour les espèces de *Pseudomonas* [332,452]. Ce milieu favorise la production de deux pigments verts : la pyocyanine et la pyoverdine par les espèces de *Pseudomonas* (Fig. 15a), qui peuvent également les produire sur une GN à 37 °C pendant 24 h (Fig. 15b). De plus, la gélose au cetrimide inhibe la croissance des Gram-positifs en raison de la présence d'acide nalidixique et de tétradonium bromide (cétrimide) dans sa composition, tout en améliorant la croissance de *Pseudomonas* sp [472].

Par conséquent, sous la lumière ultraviolette, les colonies peuvent fluorescer en vert-jaune en raison de la production de pyoverdine (Fig. 14c). Ainsi, la formation de mousse dans le bouillon LB après 72 h confirme la production de BSs (Fig. 15e) [473]. Aussi, les *Pseudomonas* donnent une couleur rouge foncé en raison de l'absorption du colorant Rouge Congo par les exopolysaccharides produits (Fig. 15f) [472].

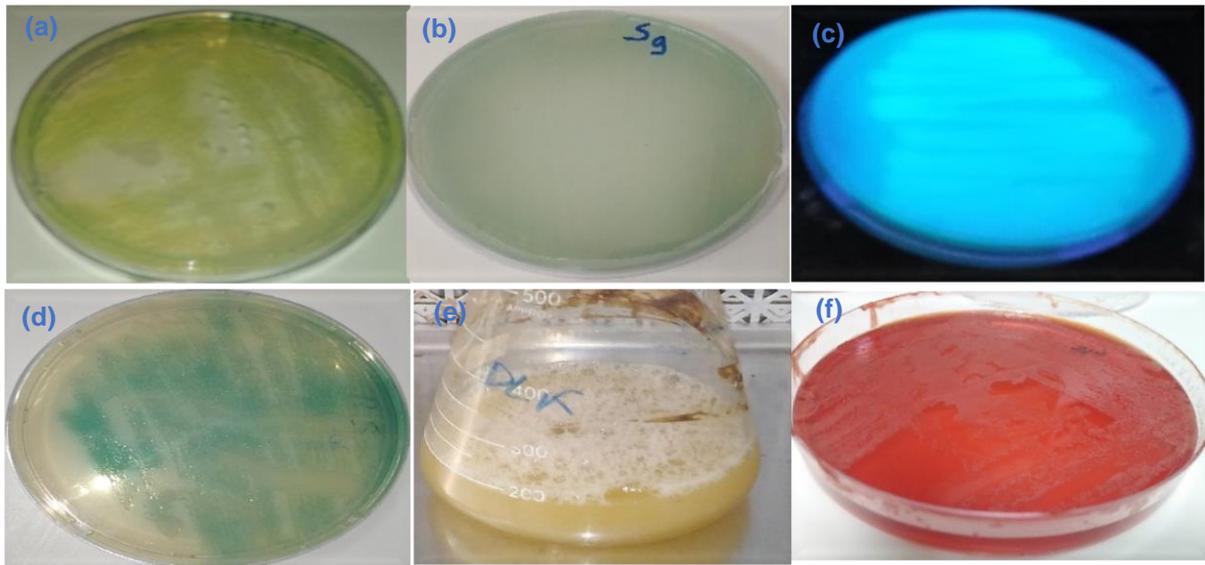


Figure 15 : Aspects macroscopiques des *P. aeruginosa* sur gélose au cétrimide (a), gélose nutritive (b), gélose au cétrimide sous UV à 366 nm (c), milieu King A (d), LB liquide (f), et milieu au rouge Congo (e).

1.1.2. Caractérisation microscopique

Les *Pseudomonas* observées au microscope optique au grossissement X 1000 sont de couleur rose, et sont associées en paire. Leur forme est celle de bacilles droits ou légèrement incurvés.

Un exemple d'aspect microscopique de quelques souches est représenté dans la Fig. 16.

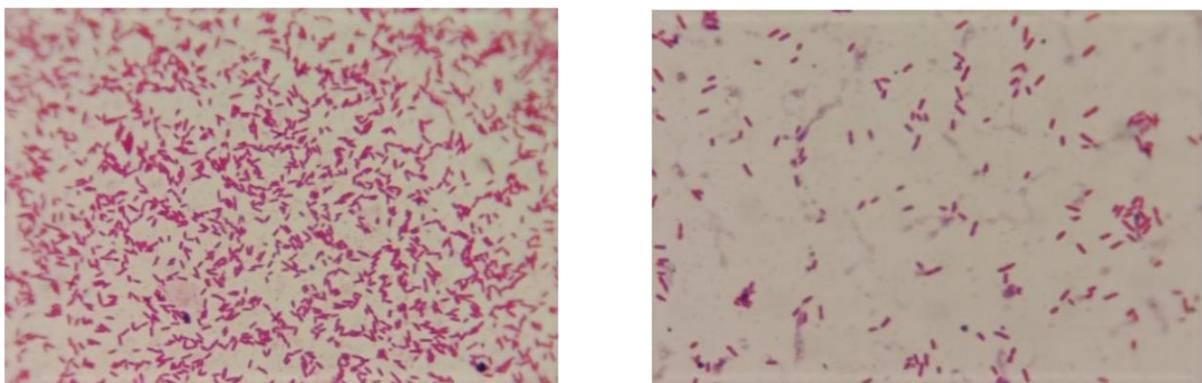


Figure 16 : Aspect microscopique après coloration de Gram (grossissement X1000).

1.2. Caractérisation physiologique

En plus des tests basés sur la morphologie des bactéries, nous avons réalisé des tests physiologiques pour comprendre et d'étudier leurs réponses et adaptations aux conditions environnementales, ainsi que leurs besoins nutritionnels et leur comportement métabolique. Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau 5.

D'après les résultats obtenus de croissance à différentes températures, toutes les souches testées sont capables de se croître à une température de 30 °C, 37 °C, et 42 °C, avec une croissance optimale à 37 °C. En revanche, aucune souche ne poussait à une température de 45 °C et 4 °C à l'exception de BSP9 qui a pu pousser à une température de 4 °C. La gamme de pH de la croissance, notée entre 4 et 8, a été observée chez la majorité des souches testées, avec une croissance optimale à pH = 7. Nos souches ont aussi développé une tolérance aux différentes concentrations en Na Cl jusqu'à 6% (tableau 5).

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les par le fait que les *P. aeruginosa* s'adaptent aux conditions environnementales spécifiques de leurs biotopes d'origine [474]. Des recherches récentes montrent que certaines souches de *P. aeruginosa* ont développé une tolérance remarquable aux différents environnements. Par exemple, souche NAPH6 présente une gamme de croissance en pH allant de 5,1 à 10,2, avec une croissance optimale à pH 7. Elle ne montre aucune croissance à pH 4,1 et pH 12. Concernant la température, NAPH6 peut croître entre 20 et 45 °C, avec un optimum à 37 °C. la souche NAPH6 présente aussi une tolérance au Na Cl allant de 0 à 10% [474]. Une autre souche, GS-33, isolée des eaux marines d'un port sur la côte sud-ouest du Gujarat, en Inde, tolère une concentration de Na Cl de 9% [475]. Par ailleurs, la souche BUR11, isolée d'un champ agricole à Burdwan, en Inde, peut se croître entre des températures de 20 °C à 50 °C et se développer dans des conditions de salinité allant jusqu'à 8% de Na Cl [476].

1.3. Caractérisation biochimique

Les tests biochimiques sont largement utilisés dans l'identification des bactéries, offrant une méthode classique mais précieuse pour déterminer des espèces et sous-espèces spécifiques. Ces tests permettent de révéler des caractéristiques

métaboliques des bactéries isolées, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de leur profil biochimique. Ces tests sont les tests les plus fiables pour l'identification des isolats typiques de *P. aeruginosa* [477].

Nos résultats révèlent que toutes les souches examinées présentent un dégagement gazeux, ce qui est dû à la présence de l'enzyme catalase. Aussi, et conformément aux *Pseudomonas*, toutes les souches étudiées possèdent l'oxydase, et elles ne présentent aucun changement pour le test TSI (tableau 6).

Parmi les souches pré-identifiées, cinq souches (BSP4, BSP6, BSP9, BSP12, et BSP13) ont été sélectionnées selon leur profil de réduction de la TS, activité émulsifiante E24, et TDH, pour une identification approfondie avec les galeries API 20NE. Tableau 6 montre le profil biochimique des isolats par galerie API 20NE, les isolats bactériens se sont avérés partager le même profil que la souche type *P. aeruginosa* DSM 50071^T. La majorité des substrats ont été métabolisés, ce qui explique la possession d'un métabolisme strictement aérobie chez les *Pseudomonas*, avec de l'oxygène comme accepteur final d'électrons ; dans certains cas, le nitrate peut être utilisé comme un accepteur alternatif d'électrons, permettant la croissance en anaérobie. [478]. Les isolats BSP4, BSP6, BSP12, et BSP13 ont pu hydrolyser tous les substrats testés, sauf la souche BSP9 qui ne montre aucune croissance envers tryptophane, glucose, esculine, 4-nitrophényl-β-D-glucopyranose, arabinose, mannose, maltose, et acide phénylacétique. Le logiciel spécifique du « UPBM » montre que ces souches sont affiliées à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, avec un pourcentage d'acceptation de 99.8 à 100%.

La souche type *P. aeruginosa* ATCC 10145^T a été notée pour se développer en présence de plusieurs substrats comme la gélatine, l'acétyl-D-glucosamine, le glycérol, le mannitol, le fructose et le galactose [479]. Aussi, souche BUR11 de *P. aeruginosa* montre une capacité de croissance en hydrolysant l'esculine et la gélatine, ainsi qu'en utilisant l'arabinose-L, le citrate, le galactose, le glucose, le malonate, le mannose-D, le xylitol et la xylose comme sources de carbone [476].

Tableau 5 : Résultats des différents tests de pré-identification.

Souche		Tests																						
		OX	CAT	TSI	Production de pigments	Forme	Gram	Croissance à différentes températures °C					Croissance à différents pH						Croissance à différentes concentrations en Na Cl %					
								4	30	37	42	45	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
Site 01	BSM1	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM2	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM3	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM4	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM5	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM6	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM7	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM8	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM9	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
	BSM10	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-
Site 02	BSHS1	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS2	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS3	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS4	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS5	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS6	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS7	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-

	BSHS8	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS9	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS1 0	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS1 1	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSHS1 2	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
Site 03	BSP1	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP2	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP3	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP4	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP5	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP6	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	+	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP7	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP8	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP9	+	+	-	+	Bacille	-	+	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP10	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP11	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP12	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP13	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP14	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-
	BSP15	+	+	-	+	Bacille	-	-	++	++	++	-	-	-	++	++	-	-	++	++	+	-	-	-

- DO₅₈₀ nm max < 0.5 (pas de croissance) ; + DO₅₈₀ nm max : 0.5-1 (croissance) ; ++ DO₅₈₀ nm max > 1 (croissance importante).

Tableau 6 : Profil biochimique des isolats par galerie API 20NE.

Substrats	BSP4	BSP6	BSP9	BSP12	BSP13	DSM 50071 ^T	ICMP 3512 ^T	DSM 291
NO ₃	+	+	+	+	+	+/-	-	-
TRP	+	+	-	+	+	-	-	-
GLU	+	+	-	+	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+
URE	+	+	+	+	+	+/-	-	-
ESC	+	+	-	+	+	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	-	-
PNG	+	+	-	+	+	+/-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	-	+	+	+/-	+	-
MNE	+	+	-	+	+	-	+	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	-
MAL	+	+	-	+	+	-	-	-
GNT	+	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+	+	+
ADI	+	+	+	+	+	+	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+
PAC	+	+	-	+	+	+/-	-	+

NO₃ Nitrate ; TRP L-tryptophane ; GLU D-glucose ; ADH L-arginine ; URE Urée ; ESC Esculine en présence de fer ; GEL Gélatine ; PNG 4-nitrophényl-β-D-glucopyranoside ; GLU D-glucose (répété) ; ARA L-arabinose ; MNE D-mannose ; MAN D-mannitol ; NAG N-acétylglucosamine ; MAL D-maltose ; GNT Gluconate de potassium ; CAP Acide caprique ; ADI Acide adipique ; MLT Acide malique ; CIT Citrate trisodique ; PAC Acide phénylacétique ; DSM 50071^T Souche type *P. aeruginosa* ; ICMP 3512^T Souche type *P. fluorescens* ; DSM 291 Souche type *P. putida*.

1.4. Caractérisation phylogénétique

Les séquences ARNr 16S des souches sélectionnées présentent une grande similarité avec *Pseudomonas aeruginosa* souche type DSM 50071^T [480]. L'étude phylogénétique a révélé que les souches testées partageaient la plus grande similarité avec les membres du genre *Pseudomonas*, spécifiquement avec l'espèce *P. aeruginosa* (Fig. 17), avec une similarité élevée de 99,40 à 99,66%. Les séquences ont été entrées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accession (OM017142– OM017145, et OM149873).

Tableau 7 : La phylogénie des souches sélectionnées selon le séquençage d'ARNr 16S.

Souches	Numéro d'accession	Nombre de nucléotides	Similarité		
			<i>P. aeruginosa</i> DSM 50071 ^T	<i>P. fluorescens</i> ICMP 3512 ^T	<i>P. putida</i> DSM 291
BSP4	OM017142	1166	99,40	94,72	94,74
BSP6	OM017143	1169	99,57	94,85	94,78
BSP9	OM149873	1058	99,43	94,64	94,61
BSP12	OM017144	1132	99,56	94,76	95,02
BSP13	OM017145	1165	99,66	94,91	94,91

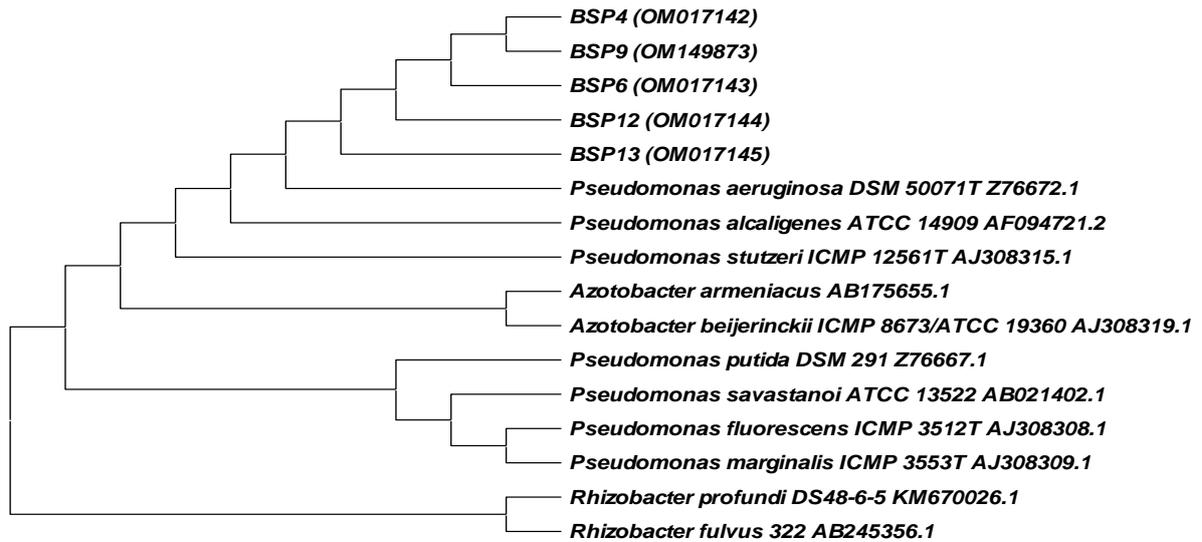


Figure 17 : Un arbre phylogénétique, construit selon la méthode du neighbor-joining avec une échelle de 0,02 substitutions par position de nucléotide des séquences ARNr 16S choisies de la famille des *Pseudomonadaceae*, trouvées grâce à BLAST, montre les relations entre les souches isolées et quelques isolats remarquables.

1.5. Profil de sensibilité et/ou résistance aux antibiotiques

Une série de tests a été faite pour caractériser 05 souches de *P. aeruginosa* selon leurs profils de résistance aux antibiotiques.

L'antibiogramme a été réalisé pour caractériser 05 souches de *P. aeruginosa* selon leurs profils de résistance *vis-à-vis* de 21 antibiotiques de différentes familles.

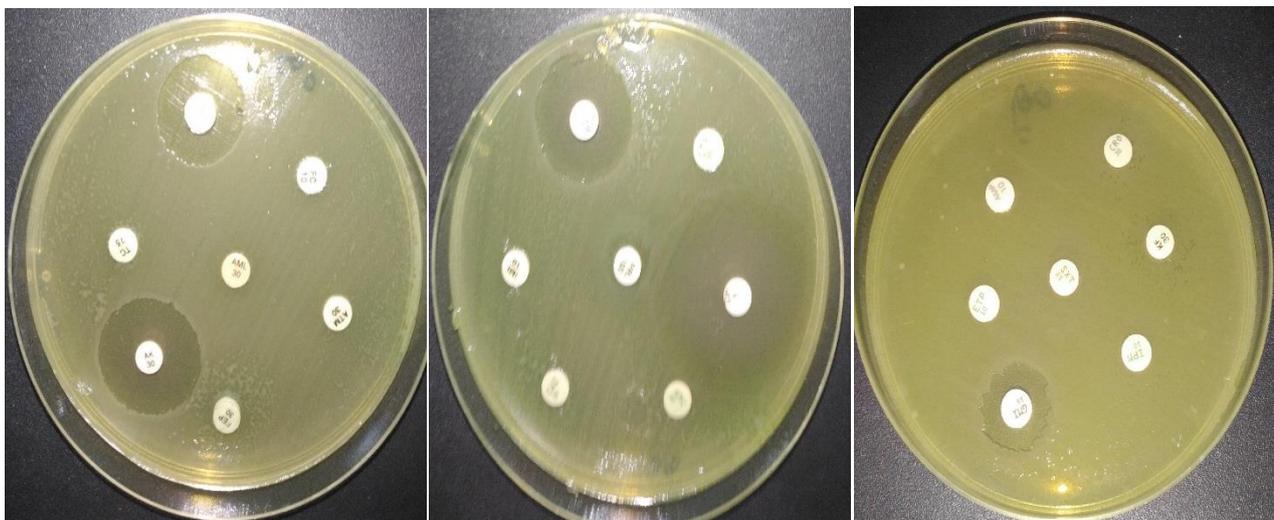


Figure 18 : Antibiogramme de la souche BSP9.

La mesure du diamètre des zones d'inhibition de chaque souche pour chacun des antibiotiques testés permet de caractériser les souches comme étant sensibles ou résistantes. Nous avons considéré les souches résistantes ou bien sensibles, conformément aux directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (33rd Edition) [481]. Quelques exemples d'antibiogramme sont exposés en Fig. 18.

D'après les résultats obtenus par antibiogramme nous avons constaté que les souches de *P. aeruginosa* testées dans cette étude ont présenté une résistance considérable à la famille des bêtalactamines, notamment *vis-à-vis* de l'imipénème, ceftazidime, amoxicilline, céfotaxime, ceftazidime, amoxicilline + acide clavulanique, ceftriaxone, ampicilline, ertapénème, amoxicilline, céfépime, pipéracilline, et céfalotine avec un taux de résistance compris entre 80 et 100%. Aussi, une résistance totale de nos souches *vis-à-vis* autres antibiotiques, de différentes familles, comme tétracycline, acide fusidique triméthoprime-sulfaméthoxazole, a été signalée. Les souches testées ont été trouvées sensibles aux fluoroquinolones comme la ciprofloxacine et l'amikacine, et à la tobramycine (famille des aminosides).

Tableau 8 : Profil de résistances chez quelques souches isolées.

Antibiotiques	Souches								
	BSP4	BSP6	BSP9	BSP12	BSP13	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 (CLSI, 2023)			
							Diamètres critiques (mm)		
							S	I	R
IMI	R	R	R	R	R	≥19	16-18	≤15	
CAZ	R	R	R	R	R	≥18	15-17	≤16	
CTX	R	R	R	R	R	≥18	15-17	≤14	
AMC	R	R	R	R	R	RN			
CIP	S	S	S	S	S	≥25	19-24	≤18	
SXT	R	R	R	R	R	RN			
GMI	I	R	I	I	I	≥19	13-18	≤12	
CRO	R	R	R	R	R	≥18	15-17	≤14	
IPM	R	R	R	R	R	≥19	16-18	≤15	
AMP	R	R	R	R	R	RN			

ETP	R	R	R	R	R	≥19	16-18	≤15
AML	R	R	R	R	R	RN		
AK	S	S	S	S	S	≥17	15-16	≤14
ATM	R	R	R	I	S	≥22	16-21	≤15
TC	R	R	R	R	R	RN		
FC	R	R	R	R	R	RN		
FEP	R	R	R	R	R	≥18	15-17	≤14
PRL	R	R	R	S	R	≥22	18-21	≤17
TOB	S	S	S	S	S	≥19	13-18	≤14
KF	R	R	R	R	R	≥18	15-17	≤14

R Résistante ; S Sensible ; I Intermédiaire (estimé selon le diamètre de la zone d'inhibition, fixé par le CLSI/SFM) ; IMI Imipénème ; CAZ Ceftazidime ; CTX Céfotaxime ; AMC Amoxicilline + acide clavulanique ; CIP Ciprofloxacine ; SXT Triméthoprimé – sulfaméthoxazole ; GMI Gentamicine ; CRO Ceftriaxone ; IPM Imipénème ; AMP Ampicilline ; ETP Ertapénème ; AML Amoxicilline ; AK Amikacine ; ATM Aztréoname ; TC Tétracycline ; FC Acide fusidique ; FEP Céfépime ; PRL Pipéracilline ; TOB Tobramycine ; KF Céphalothine ; RN Résistance naturelle.

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif omniprésente appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*, capable de survivre dans un large éventail d'environnements [482], présent à la fois dans les environnements vivants et non vivants, depuis les sols et les habitats aquatiques jusqu'aux tissus végétaux et animaux [483]. Une aptitude à s'adapter à des environnements variés est l'une des distinctives clés de *P. aeruginosa*. Cette bactérie peut se développer à la fois en aérobiose et en anaérobiose, à des températures allant jusqu'à 42 °C, et peut utiliser de nombreux composés métaboliques différents, des petites aux molécules complexes [484].

Également, la sélection du traitement le plus approprié est compliquée par la grande capacité de *P. aeruginosa* à développer ou à acquérir une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques [485–487]. Les souches de *P. aeruginosa* sont connues pour utiliser leurs niveaux élevés de mécanismes de résistance. En général, les principaux mécanismes utilisés par *P. aeruginosa* pour contrer l'attaque des antibiotiques peuvent être classés en résistance intrinsèque, acquise et adaptative [488].

P. aeruginosa présente une résistance à une variété d'antibiotiques, y compris les β -lactames, les aminoglycosides, et les quinolones [489]. La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* comprend une faible perméabilité de la membrane externe, l'expression de pompes d'efflux qui expulsent les antibiotiques hors de la cellule et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques. La résistance acquise de *P. aeruginosa* peut être obtenue par transfert horizontal de gènes de résistance ou par mutation [488]. La résistance adaptative aux antibiotiques de *P. aeruginosa* est un mécanisme récemment caractérisé, implique la formation d'un biofilm, où le biofilm sert de barrière de diffusion pour limiter l'accès des antibiotiques aux cellules bactériennes [490]. En outre, des cellules persistantes multi tolérantes à plusieurs médicaments et capables de survivre à une attaque antibiotique et sont responsable de la récalcitrance et de la rechute des infections peuvent se former dans le biofilm [482].

Récemment, l'antibiotique ciprofloxacine montre la plus grande efficacité contre les souches de *P. aeruginosa*, isolées de deux stations de traitement des eaux usées dans le gouvernorat d'Aden au Yémen, avec le taux de résistance le plus bas (7,7%), suivi par la lévofloxacine, l'ofloxacine et la pipéracilline/tazobactam, dont

les taux de résistance sont de (12,3%), (18,5%) et (20%) respectivement [491]. Également, des isolats de *P. aeruginosa* provenant des eaux usées hospitalières en République tchèque ont montré des valeurs de résistance plus élevées *vis-à-vis* de la ciprofloxacine (30.5%), de la gentamicine (28.8%) et du méropénem (27.2%). Les isolats de *P. aeruginosa* ont également montré une résistance à la ceftazidime (11.5%), à l'amikacine (11.5%), à la piperacilline-tazobactam (11.5%) et à l'aztréonam (8.5%). Dix-sept souches de *P. aeruginosa* (28.8%) ont été classées comme multirésistantes (MDR) [492]. Des isolats de *P. aeruginosa* provenant des eaux usées hospitalières de Dhaka, au Bangladesh, ont présenté des niveaux de résistance variés aux différents antibiotiques, avec plus de 80% des isolats restant sensibles au méropénem, à l'amikacine et à la gentamicine. Les résultats ont révélé que 93.82% des isolats étaient classés comme multirésistants (MDR) et que 71 des 76 isolats MDR avaient l'aptitude de former des biofilms [493].

Une proportion importante des souches de *P. aeruginosa* isolées des effluents d'eaux usées hospitalières ont montré une sensibilité à l'imipénème (93%), la tobramycine (85%), la norfloxacine (85%), l'aztréonam (70%), la ciprofloxacine (51%), le méropénème (47%), la lévofloxacine (43%) et la gentamicine (40%). En revanche, une faible sensibilité a été enregistrée pour l'amikacine et la ceftazidime [494].

Bien que *P. aeruginosa* soit reconnu comme un pathogène opportuniste, l'exploration extensive des souches de *P. aeruginosa* et de leurs métabolites dans plusieurs domaines biotechnologiques, tels que les sciences de l'environnement, est remarquable. Ces risques peuvent être atténués par l'utilisation d'environnements contrôlés tels que les bioréacteurs ou par la mise en œuvre de mesures de confinement spécifiques [9].

2. Production des biosurfactants

2.1. Tests de screening préliminaires des isolats producteurs de biosurfactants

La majorité des techniques utilisées pour dépister les souches productrices de BSs reposent sur les propriétés physiques des tensioactifs [461]. Une stratégie de criblage efficace est la clé du succès pour isoler de nouveaux microbes intéressants et producteurs de BSs. Plusieurs techniques de dépistage telles que l'essai de CTAB agar ne sont applicables qu'à une gamme restreinte de BSs. Les procédures de dépistage pourraient fournir des résultats qui sont soit qualitatifs, soit quantitatifs. Les approches qualitatives sont généralement suffisantes pour un dépistage initial des isolats.

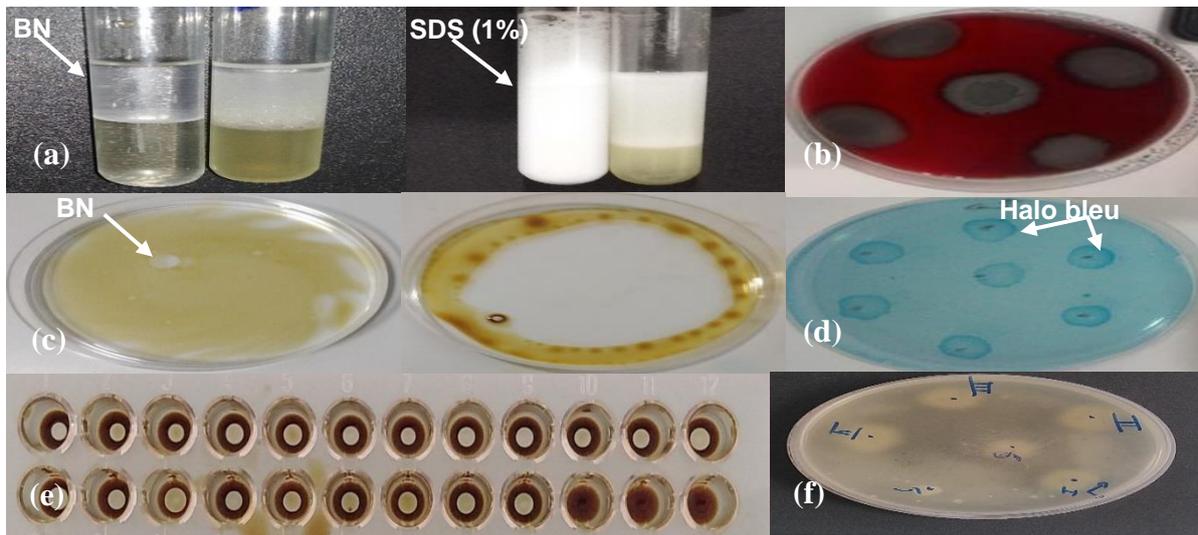


Figure 19 : Caractérisation des rhamnolipides basée sur : l'indice E24 (comparé au BN comme contrôle négatif et au SDS (1%) comme contrôle positif) (a), test hémolytique (b), test de déplacement d'huile (comparé au BN comme contrôle négatif) (c), test de gélose au CTAB (d), test d'effondrement de goutte (e), et test de superposition d'hydrocarbures sur gélose (f).

Dans ce contexte, les souches isolées ont été subies sur les principaux testes qualitatifs et quantitatifs (Fig. 19). Utilisation de l'huile d'olive comme source de carbone et également comme substrat adéquat pour induire la production de BSs [314,398,469]. L'utilisation du BN comme milieu de culture pour la production des BSs est mentionnée en littérature [201,495].

2.1.1. Tests qualitatifs

L'essai hémolytique est la première étape pour identifier les souches productrices de BSs [473]. L'ensemble des souches ont montré des résultats positifs (tableau 10), formant une zone blanche nette autour des colonies inoculées classées comme β -hémolyse (Fig. 19b) [459].

Pareillement, la méthode de CTAB est utilisée pour identifier les microorganismes sécrétant des tensioactifs anioniques [473]. De plus, lorsque les colonies sont inoculées sur de l'agar CTAB, elles présentent des halos bleu foncé. Ils sont considérés comme positifs pour la production de rhamnolipides (Fig. 19d) puisque les rhamnolipides anioniques sont composés d'une queue non polaire et d'une partie tête polaire qui réagit avec le CTAB cationique pour générer des paires d'ions insolubles qui précipitent sous forme de zones bleu foncé sur un fond bleu [461].

Les résultats exposés dans le tableau 10 révèlent la détection de BSs pour l'ensemble des souches testées par TEG due à la chute des gouttes de surnageant contenant des agents de surface qui traversent la couche huileuse tout en réduisant la force ou la tension interfaciale entre la goutte de liquide et la surface hydrophobe (Fig. 19e). La stabilité des gouttes dépend de la concentration en tensioactifs et est corrélée à la tension superficielle et interfaciale [461].

Par ailleurs, Fig. 19f montre des colonies entourées d'halos émulsionnés due à la libération de BSs. Méthode de recouvrement à base d'hydrocarbures sur gélose (MRHG) a été utilisée pour identifier les bactéries hydrocarbonoclastes [496]. Elle montre l'activité de dégradation des hydrocarbures. L'évaluation quantitative des bioémulsifiants (tableau 10) a montré que toutes les souches donnent une croissance sur milieu recouvert par une fine couche de kérosène et ont généré une zone de clairance.

Par ailleurs, l'apparition des zones claires de diamètres variables tout au long du test de déplacement d'huile (TDH) (Fig. 19c) indique la libération de BSs. Les diamètres les plus élevés ont été obtenus pour les souches isolées à partir des stations d'épurations des eaux usées (tableau 9).

Tableau 9 : Résultats de différents tests qualitatifs de souches isolées.

Souches		Tests qualitatifs				
		TH	CTAB	TEG	MRHG	TDH
Site 01	BSM1	+	+	+	+	++
	BSM2	+	+	+	+	++
	BSM3	+	+	+	+	++
	BSM4	+	+	+	+	++
	BSM5	+	+	+	+	++
	BSM6	+	+	+	+	++
	BSM7	+	+	+	+	++
	BSM8	+	+	+	+	++
	BSM9	+	+	+	+	++
	BSM10	+	+	+	+	++
Site 02	BSHS1	+	+	+	+	+
	BSHS2	+	+	+	+	+
	BSHS3	+	+	+	+	+
	BSHS4	+	+	+	+	+
	BSHS5	+	+	+	+	+
	BSHS6	+	+	+	+	+
	BSHS7	+	+	+	+	+
	BSHS8	+	+	+	+	+
	BSHS9	+	+	+	+	+
	BSHS10	+	+	+	+	+
	BSHS11	+	+	+	+	+
	BSHS12	+	+	+	+	+
Site 03	BSP1	+	+	+	+	+++
	BSP2	+	+	+	+	+++
	BSP3	+	+	+	+	+++
	BSP4	+	+	+	+	+++
	BSP5	+	+	+	+	+++
	BSP6	+	+	+	+	+++
	BSP7	+	+	+	+	+++
	BSP8	+	+	+	+	+++
	BSP9	+	+	+	+	+++
	BSP10	+	+	+	+	+++
	BSP11	+	+	+	+	+++
	BSP12	+	+	+	+	+++
	BSP13	+	+	+	+	+++
	BSP14	+	+	+	+	+++

	BSP15	+	+	+	+	+++
--	-------	---	---	---	---	-----

2.1.2. Tests quantitatifs

La mesure de la tension superficielle (TS) du surnageant de culture de chaque souche a été déterminée à l'aide un tensiomètre (Fig. 20). Nos résultats soulignent une réduction significative de la TS par les souches isolées de la station d'épuration de Chlef, de 58,64 à 32,68 mN m⁻¹ inscrit par la souche BSP13, ou la TS finale des souches comprises entre 32,68 et 51,05 mN m⁻¹. Pour les isolats de la station d'épuration de Mascara, la réduction de la TS était entre 47,02 et 57,97 mN m⁻¹. Par contre, une réduction faible de la TS a été notée pour les souches isolées de la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine (TS = 50,26–57,48 mN m⁻¹).

Ces données indiquent ainsi une activité émulsifiante (E24) intéressante marquée par les isolats de la station d'épuration de Chlef avec des valeurs variées entre 12 et 71,25%. Des pourcentages de 1,85 à 60,41% observés chez les souches obtenues de la station d'épuration de Mascara, et des valeurs comprises entre 6,16 à 30,35% pour les isolats provenus de la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine (Fig. 20).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature. Déziel a observé que les micro-organismes présents dans un sol contaminé par des hydrocarbures bénéficiaient d'un avantage compétitif grâce à la production d'agents émulsifiants [497]. Nos investigations ont signalé que les souches isolées de deux stations d'épurations sont les plus performantes. En fait, ces résultats sont cohérents avec les recherches de Bendaha qui a examiné la capacité de certaines souches de *Pseudomonas*, isolées à partir de différentes stations d'épuration, de réduire la TS avec des valeurs estimées entre 30,89 et 50,47 mN m⁻¹. D'autre part, des taux d'activités d'émulsifiants ont été notés entre 5,4 et 44,27 % [498]. De même, Meliani et *al.* ont isolé trois souches appartenant aux PGPR, dont une souche de *P. aeruginosa*, isolée du sol superficiel contaminé de la région de Mascara, a pu réduire la TS jusqu'à 55 mN m⁻¹ avec E24 de 25,29% [499]. En outre, des isolats bactériens isolés d'un site hautement contaminé dans la région d'Ain El Arbaa à Ain Temouchent, identifiés comme étant *P. aeruginosa*, ont montré leurs capacités prometteuses de synthétiser des BS avec une diminution remarquable de la TS (TS =

35,5–47 mN m⁻¹) et un potentiel d'émulsification (E24 = 8,33–15,27%) [14]. En outre, l'étude Zenati et *al.* a mis en évidence le potentiel d'un isolat, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 isolée du port de pêche fortement contaminé par des produits pétroliers situé dans la baie de Bou-Ismaïl, port de pêche de Khemisti (Tipaza), à diminuer la TS du milieu de 53,1 à 28,8 mN m⁻¹, après 3 jours d'incubation [500]. De plus, Ferradji et *al.* ont signalé l'aptitude de trois souches de *Streptomyces*, isolées du sol de la plaine de la Mitidja, à sécréter des BSs avec des activités d'émulsification maximales enregistrées entre 75,83% et 86,66% [501]. Pareillement, Djoued a cité des souches, identifiées comme *Rhodococcus* et isolées à partir de différentes zones polluées par des hydrocarbures en Algérie, ayant un pouvoir d'émulsifications entre 4,45 et 54,54% [502].

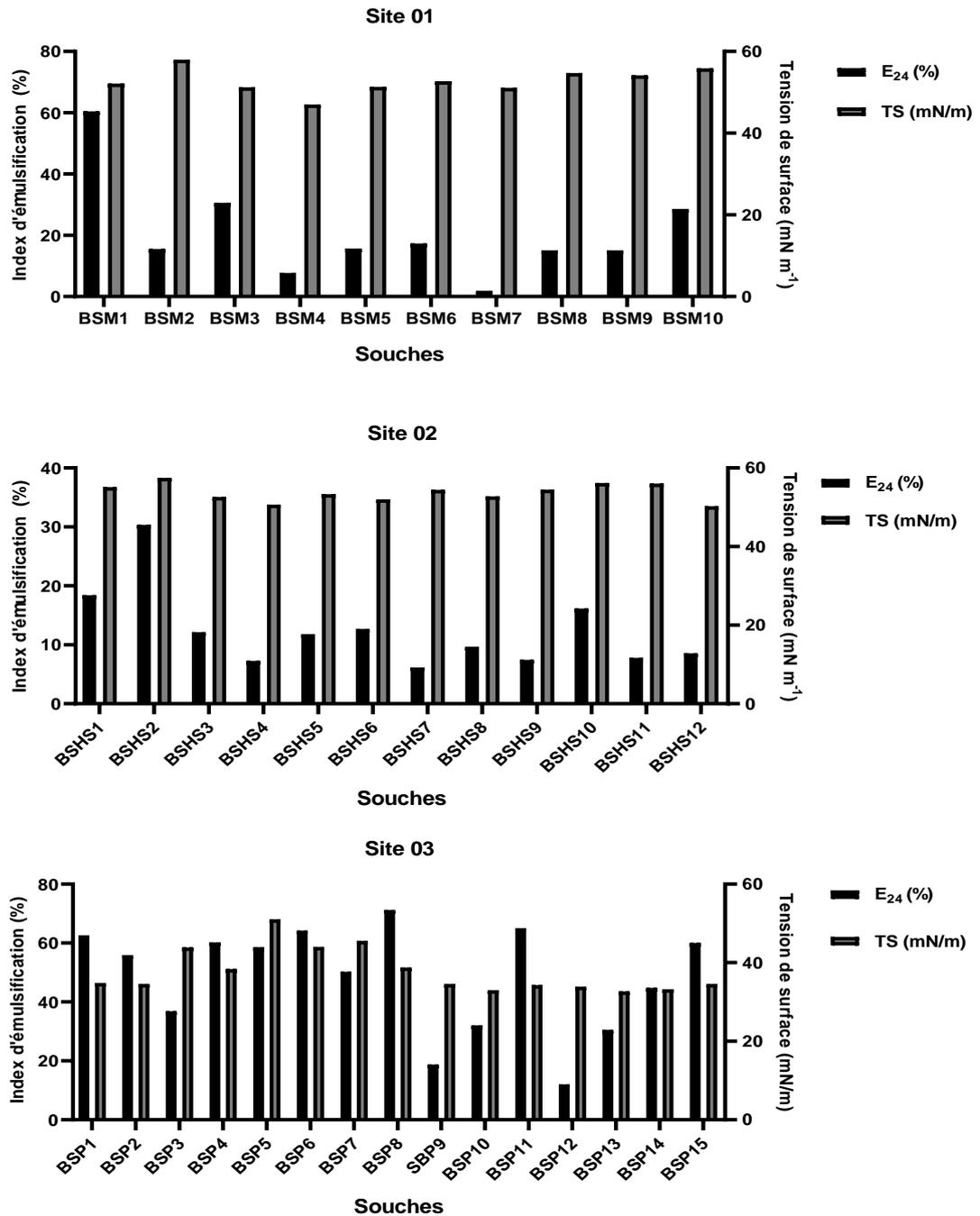


Figure 20 : Screening quantitatif, basé sur l'activité d'émulsification (E₂₄) et la réduction de la tension de surface (TS), des souches isolées de différents sites pollués.

2.2. Evaluation de la production de biosurfactants sur différents substrats

2.2.1. Production de biosurfactants par la souche BSP4

La production de biosurfactants par la souche BSP4 a été évaluée en utilisant du BN enrichi avec différents substrats. Ces substrats comprenaient l'huile d'olive, l'huile de friture usée, le glycérol, le kérosène, l'huile moteur usée et le pétrole brut (1 %, v/v). Une croissance importante sur le BN ($DO_{max} = 2,3$), ainsi que sur les huiles végétales : l'huile d'olive ($DO_{max} = 2,53$), et l'huile de friture usée ($DO_{max} = 1,61$), a été marquée. La croissance diminue ensuite en glycérol, le kérosène, le pétrole brut, et l'huile de moteur usée (de 1,58 à 1,001) (tableau 11).

La souche BSP4 a montré une activité d'émulsification plus élevée (E24) (tableau 11) lors de la culture sur de l'huile d'olive, de l'huile de friture usée et du glycérol (1%, v/v) jusqu'à $60,2 \pm 5,3\%$, $57,51 \pm 2,32\%$, et $56,43 \pm 2,94\%$, respectivement, par rapport au pétrole brut ($E24 = 55,07 \pm 2,06\%$), au kérosène ($E24 = 49,68 \pm 2,68\%$) et à l'huile moteur usée ($E24 = 42,14 \pm 4,41\%$). De plus, la visibilité de zones claires de diamètres variables tout au long du test de déplacement d'huile (TDH) indique la sécrétion de biosurfactants [503]. Le TDH le plus élevé a été obtenu dans le cas de l'huile d'olive ($TDH = 72,4 \pm 5,33$ mm), suivie de l'huile de friture usée ($TDH = 70,63 \pm 2,58$ mm) et du kérosène ($TDH = 60,1 \pm 1,41$ mm) (tableau 11). La fonctionnalité du biosurfactant permettant de diminuer la tension de surface (TS) de 8 mN m^{-1} le qualifie de biosurfactant potentiellement efficace [504]. La souche BSP4 permet d'abaisser significativement la TS du BN enrichi en huiles végétales et en glycérol par rapport aux hydrocarbures. En effet, une réduction de la tension superficielle de 58.53 ± 1.18 to $30.35 \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$ a été enregistrée lorsque BSP4 était cultivé sur NB additionné d'huile d'olive. De plus, dans le cas des hydrocarbures, le pétrole brut s'est avéré être le substrat le plus favorable, avec une réduction de TS intéressante atteignant $32.71 \pm 0.24 \text{ mN m}^{-1}$ (tableau 11).

Tableau 10 : Production de biosurfactants par la souche BSP4 sur milieu BN enrichi avec différents substrats.

Souche	Substrats (v/v)	DO _{max} (600 nm)	Rendements (g L ⁻¹ ± SD)	CMCs (g L ⁻¹)	Caractéristiques de biosurfactants				Références
					TS (mN m ⁻¹ ± SD)		E24 (% ± SD)	TDH (mm ± SD)	
					TS _i	TS _f			
<i>P. aeruginosa</i> BSP4	Huile d'olive (1%)	2,53 ± 0,03****	4,42 ± 2,13****	0,35	58,53 ± 1,18	30,35 ± 0,2****	60,2 ± 5,3****	72,4 ± 5,33****	Cette étude
	Huile de friture usée (1%)	1,61 ± 0,04****	5,09 ± 0,91****		53,13 ± 0,97***	31,75 ± 0,6****	57,51 ± 2,32****	70,63 ± 2,58****	
	Glycérol (1%)	1,58 ± 0,02****	2,24 ± 0,17**		54,6 ± 1,08**	30,37 ± 1,36****	56,43 ± 2,94****	37,1 ± 3,20	
	Kérosène (1%)	1,005 ± 0,01****	4,42 ± 1,31****		50,03 ± 0,97****	34,37 ± 2,35****	49,68 ± 2,68****	60,1 ± 1,41****	
	Pétrole brut (1%)	1,001 ± 0,04****	2,67 ± 0,61**		48,16 ± 1,19****	32,71 ± 0,24****	55,07 ± 2,06****	36,5 ± 4,7	
	Huile de moteur usée (1%)	1,014 ± 0,00****	2,27 ± 0,35*		45,4 ± 1,3****	36,81 ± 1,02****	42,14 ± 4,41****	43,7 ± 9,4**	
<i>P. cepacia</i> CCT6659	Huile de friture (2%)	nd	8	0,6	65	25,5	10,5 ± 3,2	nd	[505]
<i>Pseudomonas</i> sp. TMB2	Glucose (2%)	nd	2,8 ± 0,5	0,12	71,9	33,4	78,6	nd	[408]
<i>P. aeruginosa</i> NJ2	Huile de friture (2%), Glucose (2%)	nd	4,28	0,15	43,15	30,15	62,07	nd	[401]
<i>Pseudomonas</i> sp. LGMS7	Glycérol (2%)	0,9	1,26 ± 0,57	0,8	60	30 ± 0,65	66,66 ± 3,46	40	[14]
<i>P. aeruginosa</i> NAPH6	Huile d'olive (1%)	1,88 ± 0,2	2	0,2	65 ± 0,66	31 ± 1,33	nd	87 ± 0,6	[9]

CMC Concentration micellaire critique ; E24 Indice d'émulsification ; TDH Test de déplacement d'huile ; TS Tension superficielle ; TS_i : Tension superficielle initiale ; TS_f : Tension superficielle finale ; DO max Densité optique maximale ; SD Écart-type ; nd non déterminé. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois répliques ± l'écart-type. L'astérisque indique $p < 0,05$ par rapport au contrôle abiotique (bouillon nutritif). (* < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 ; **** < 0,0001)

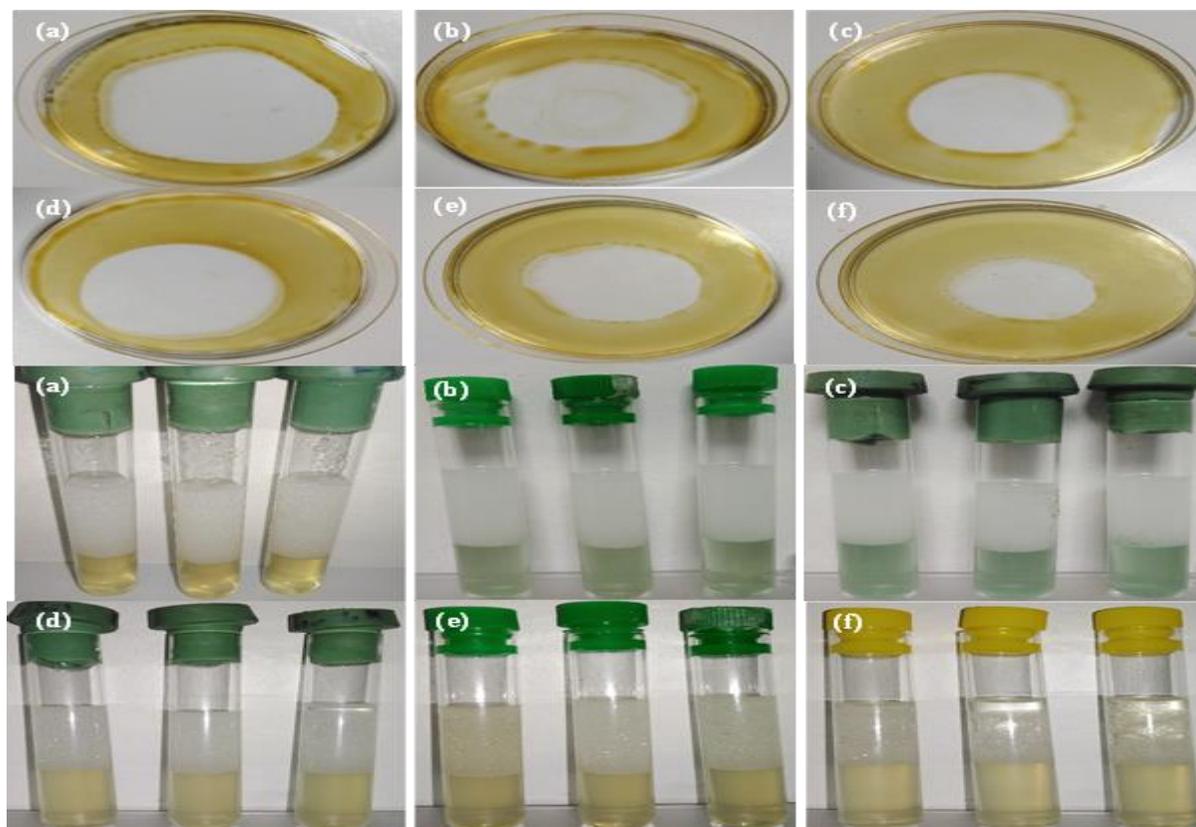


Figure 21 : Évaluation de la production de rhamnolipides par la souche BSP4 en présence de divers substrats : huile d'olive (a), huile de friture utilisée (b), glycérol (c), kérosène (d), pétrole brut (e) et huile moteur utilisée (f).

Selon la littérature, le type de substrat de carbone influence de manière significative le rendement en biosurfactant [347,396]. Compte tenu de leurs coûts de production élevés, de nombreuses recherches ont donné la priorité à l'utilisation de sources durables et bon marché comme substrats pour réduire les coûts [395]. De plus, des rapports indiquent que l'utilisation de bouillon nutritif peut augmenter efficacement la production de biosurfactants [384,396]. L'effet observé peut s'expliquer par l'abondance de protéines dans ce milieu. Nos résultats ont révélé que les rendements de biosurfactants les plus élevés, $5,09 \pm 0,91 \text{ g L}^{-1}$, $4,42 \pm 0,84 \text{ g L}^{-1}$, et $4,42 \pm 1,31 \text{ g L}^{-1}$, ont été observés lors de l'utilisation de BN contenant respectivement de l'huile de friture usée, de l'huile d'olive et du kérosène. En revanche, les faibles rendements de $2,24 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$, $2,67 \pm 0,61 \text{ g L}^{-1}$, et $2,27 \pm 0,35 \text{ g L}^{-1}$ de biosurfactants ont été enregistrés lorsque le glycérol, le pétrole brut et l'huile de moteur usagée ont été, respectivement, ajoutés au milieu BN (tableau. 11).

2.2.2. Production des biosurfactants par la souche BSP9

En raison de leurs coûts de production considérables, de nombreuses études de recherche ont mis l'accent sur l'utilisation de sources de substrat peu coûteuses et durables pour réduire les coûts [395]. Dans ce contexte, nos résultats ont révélé que le rendement en BS le plus élevé, $5,27 \pm 2,87 \text{ g L}^{-1}$, a été noté après l'utilisation du milieu LB. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'abondance de protéines dans ce milieu [384]. Concernant les huiles végétales, BSP9 pourrait produire $4,10 \pm 1,02 \text{ g L}^{-1}$, $2,36 \pm 0,69 \text{ g L}^{-1}$ et $1,70 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ de BS, en utilisant respectivement de milieu de base contenant d'huile d'olive, d'huile de friture usée et de résidus d'huile de thon.

Pareillement, Une croissance importante sur le LB ($\text{DO}_{\text{max}} = 4,48$), ainsi que sur les huiles végétales : l'huile d'olive ($\text{DO}_{\text{max}} = 2,62$), l'huile de friture usée ($\text{DO}_{\text{max}} = 2,07$), et les résidus d'huile de thon ($\text{DO}_{\text{max}} = 2,66$), a été marquée (tableau 12).

De même, la fonctionnalité de la BS permettant de diminuer la TS de 8 mN m^{-1} la qualifie de BS potentiellement efficace [504]. La souche BSP9 peut abaisser de manière suggestive la TS du milieu LB et du MB enrichi en huiles végétales. Certes, une diminution de TS de $57,06 \pm 0,70$ à $33,30 \pm 0,00 \text{ mN m}^{-1}$ a été enregistrée lorsque BSP4 était cultivé sur milieu LB. De plus, dans le cas des huiles

végétales, résidus d'huile de thon s'est avéré être le substrat le plus favorable, avec une réduction intéressante de la TS de $49,36 \pm 0,61$ à $34,76 \pm 0,23 \text{ mN m}^{-1}$, par rapport à l'huile d'olive (de $44,2 \pm 0,20$ à $32,13 \pm 0,46 \text{ mN m}^{-1}$), et à l'huile de friture usée (de $41,06 \pm 1,10$ à $33,13 \pm 0,95 \text{ mN m}^{-1}$) (tableau 12). De plus, la visibilité de zones claires de diamètres variables tout au long du TDH indique la sécrétion de BS [503]. Le TDH le plus élevé a été obtenu dans le cas du MB enrichi en huile de friture usée (TDH = $87,64 \pm 0,26 \text{ mm}$), suivi de MB + huile d'olive (TDH = $82,1 \pm 0,79$) et MB + résidus d'huile de thon (TDH = $81,62 \pm 5,69 \text{ mm}$) (tableau 12).

Tableau 11 : Production de biosurfactants par la souche BSP9 sur milieu de base (MB) enrichi avec différents substrats.

Souche	Sources de carbon (v/v)	DO _f (600 nm)	Rendement (g L ⁻¹ ± SD)	Caractéristiques de biosurfactant		
				TS (mN m ⁻¹ ± SD)		TDH (mm ± SD)
				TS _i	TS _f	
BSP9	Huile d'olive (1%)	2.62 ± 0.00****	4.10 ± 1.02**	44.2 ± 0.20****	32.13 ± 0.46****	82.1 ± 0.79****
	Huile de friture usée (1%)	2.07 ± 0.01****	2.36 ± 0.69	41.06 ± 1.10****	33.13 ± 0.95****	87.64 ± 0.26****
	Résidus d'huile de thon en conserve (1%)	2.66 ± 0.05****	1.70 ± 0.01	49.36 ± 0.61*	34.76 ± 0.23****	81.62 ± 5.69****
	Milieu LB	4.48 ± 0.04****	5.27 ± 2.87***	57.06 ± 0.70*	33.30 ± 0.00****	73.1 ± 4.40****
	Milieu de base (Contrôle biotique)	0.1 ± 0.00	0.0 ± 0.00	52.96 ± 2.47	58.66 ± 1.09	11.83 ± 1.60

CMC Concentration micellaire critique ; TDH Test de déplacement d'huile ; TS Tension de surface ; TS_i: Tension de surface initiale; TS_f: Tension de surface finale; DO_f Densité optique finale; BSs Biosurfactants; SD Standard deviation. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois répétitions ± l'écart-type (le rendement de production de la BS a été effectué sur deux répétitions indépendantes). L'astérisque indique p < 0,05 par rapport au contrôle biotique. (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 ; **** < 0.0001)

BSP4 et BSP9 ont montré un potentiel prometteur pour la production de BS à partir de diverses sources de carbone, en particulier d'huile de friture usée et de résidus d'huile de thon, ces deux substrats sont considérés comme durables. Dans la littérature récente, la souche LGMS7 de *Pseudomonas* sp. a été rapporté pour sa capacité à libérer des BSs à partir du glycérol 2% (v/v), diminuant la TS du milieu jusqu'à $30 \pm 0,65 \text{ mN m}^{-1}$, avec des valeurs E24 de $66,66\% \pm 3,46$ et un diamètre de

40 mm pendant TDH [14]. De plus, Hentati et al (2021) ont noté que la souche marine *P. aeruginosa* NAPH6 présentait une capacité importante à diminuer la TS de $65 \pm 0,66$ à $31 \pm 1,33$ mN m⁻¹ et de $63 \pm 0,71$ à $31 \pm 1,66$ mN m⁻¹ lors de la culture en présence d'huile d'olive, et d'huile de friture usée (1%, v/v), respectivement. En outre, les diamètres des tests de déplacement d'huile étaient de $8,7 \pm 0,06$ cm pour l'huile d'olive et l'huile de friture usée. Parmi les hydrocarbures

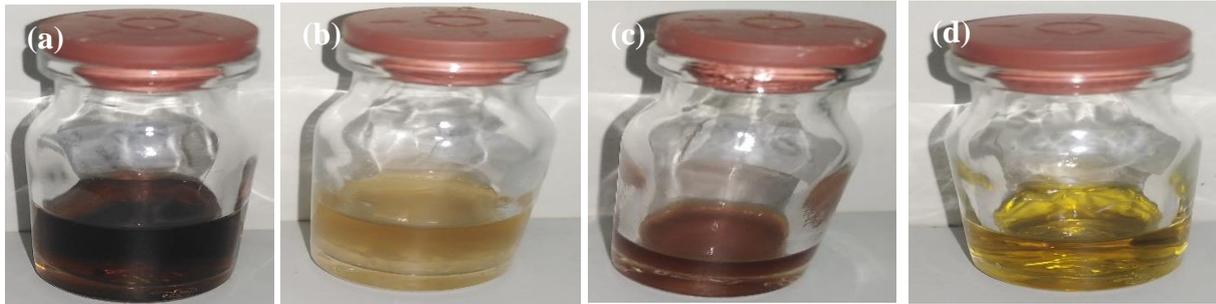


Figure 22 : Les biosurfactants produits à partir d'huile de friture usée (a), résidus d'huile de thon (b), huile d'olive (c), et glycérol (d).

testés, l'huile moteur usée (1%, v/v) s'est révélée être le meilleur substrat (TS = $41 \pm 1,33$ mN m⁻¹, TDH = $5,2 \pm 0,2$ cm). Aussi, la souche TMB2 de *Pseudomonas* sp. a montré une aptitude à abaisser la TS de 71,9 à 33,4 mN m⁻¹ en présence d'un milieu de base contenant du glucose, avec une activité d'émulsification élevée de 78,6%, selon Haloi et al. (2020). Pareillement, il en ressort que la souche S2WE de *Pseudomonas* sp. a abaissé la TS à $33,15 \pm 0,07$ mN m⁻¹ en présence d'un MB contenant 2% de glycérol, avec un diamètre de TDH de $2,9 \pm 0,7$ cm [508].

Selon des études antérieures, il a été démontré que la synthèse de BS peut être induite par des substrats hydrophobes comme les huiles végétales et les hydrocarbures. Ces derniers ne sont pas aussi biodégradables que les huiles végétales, ce qui entraîne une croissance cellulaire limitée et par conséquent une production réduite de BS [142]. De plus, le BN contient des éléments riches en azote tels que la peptone, l'extrait de bœuf et l'extrait de levure qui peuvent augmenter efficacement la production [396].

2.3. Caractérisation des biosurfactants produits par les souches étudiées

2.3.1. Identification structurale des biosurfactants

2.3.1.1. Spectroscopie infrarouge FTIR

L'analyse FTIR a joué un rôle crucial dans l'identification de groupes fonctionnels spécifiques dans les biosurfactants. Le spectre FTIR pour Rhl-BSP4, comme le montre la Fig. 23, révèle des bandes d'absorption significatives. Une bande puissante à 3336 cm^{-1} indique des liaisons -OH . Une autre caractéristique remarquable est la bande à 2131 cm^{-1} , signifiant la présence de groupes -CH_3 dans le fragment rhamnose et la partie lipophile du rhamnolipide. De plus, la bande à 1639 cm^{-1} indique l'apparition d'un groupe carbonyle -CO , une caractéristique de l'ester. Les bandes à 1430 cm^{-1} et 1367 cm^{-1} sont liées aux vibrations de déformation C-H et O-H. Les pics à 1223 cm^{-1} et 1103 cm^{-1} indiquent le groupe C-O-C. La bande d'absorption à 671 cm^{-1} est due au groupe $(\text{-CH}_2)_n$.

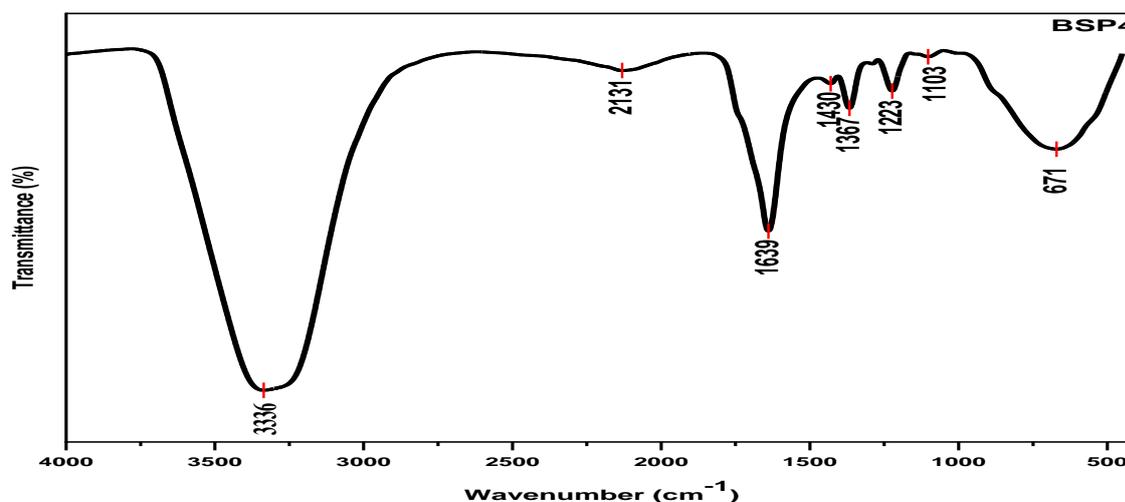


Figure 23 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) du biosurfactant Rhl-BSP4.

Une analyse FT-IR a été également réalisée pour détecter l'existence de groupes fonctionnels du BS produit par BSP9. Le spectre FTIR pour BS-BSP9, comme le montre la Fig. 24, révèle des bandes d'absorption significatives. Une bande forte à 3267 cm^{-1} indique des liaisons -OH . Une autre caractéristique remarquable est les bandes à 2925 cm^{-1} et 2856 cm^{-1} , signifiant l'apparition des groupes d'étirement symétriques -CH et -CH_2 dans la partie lipophile du

rhamnolipide, respectivement. Une bande à 1704 cm^{-1} est liée à l'existence d'un groupe aldéhyde dans le rhamnolipide. De plus, la bande à 1379 cm^{-1} indique l'apparition d'un groupe carbonyle $-\text{CO}$, une caractéristique de l'ester. Les pics à 1238 cm^{-1} et 1039 cm^{-1} indiquent le groupe $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Les bandes d'absorption à 752 cm^{-1} et 604 cm^{-1} sont dues au groupe $(-\text{CH}_2)_n$.

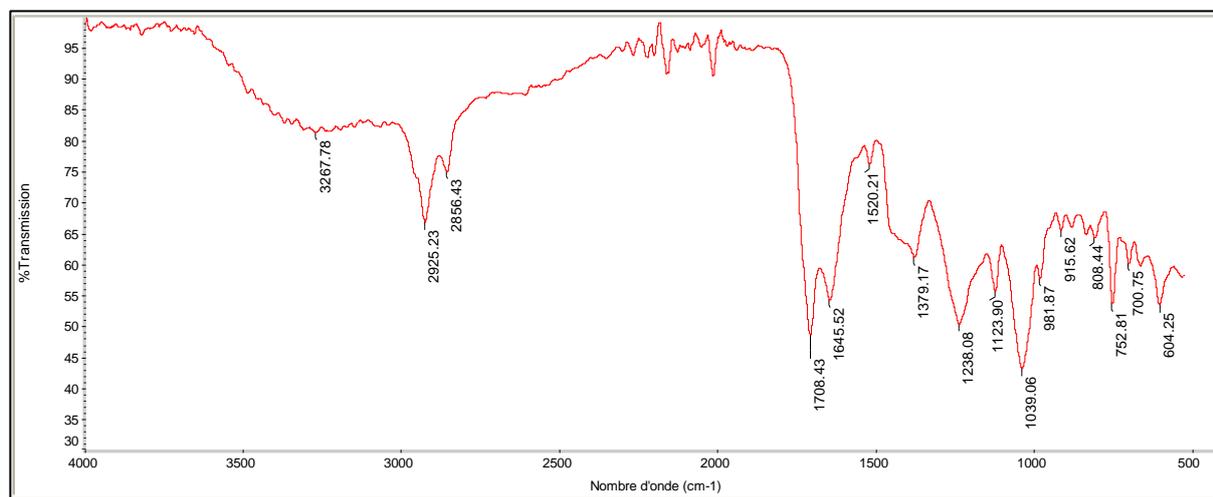


Figure 24 : Spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) du biosurfactant BS-BSP9.

Selon l'analyse des spectres FTIR, les groupes de structure chimique prédominants de Rhl-BSP4 et BS-BSP9 correspondent aux traits distinctifs du rhamnolipide (y compris les chaînes aliphatiques et le rhamnose) [14,142,405,509]. Il serait intéressant d'utiliser des techniques de chromatographie pour purifier le biosurfactants et déterminer leur structure rhamnolipidique potentielle, caractéristique déterminante des principaux BS produits par les espèces de *Pseudomonas*. Néanmoins, dans certains contextes environnementaux, le processus de purification peut entraîner des coûts élevés, ce qui rend l'utilisation de composés semi-purifiés une approche plus avantageuse et efficace.

2.3.1.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton ^1H RMN

La spectroscopie RMN s'avère utile pour discerner les caractéristiques structurales des rhamnolipides [282]. Le rhamnolipide Rhl-BSP4 produit a également été soumis à une analyse RMN ^1H , comme le montre la Fig. 25a. Les atomes de protons du cycle rhamnose et de la partie aliphatique sont apparus dans le rhamnolipide brut. Par ailleurs, un déplacement chimique distinctif est apparu à 0,88

ppm, correspondant à $-\text{CH}_3$ (chaîne aliphatique). De plus, un déplacement chimique à 1,26 ppm indiquait $-(\text{CH}_2)_n-$ (chaîne aliphatique) et $-\text{CH}_3$ (rhamnose). Aussi, les déplacements de protons variaient entre 2.04–2,34 ppm, indiquant $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ (acides gras). Les déplacements chimiques des protons se situent entre 3.23–3.38, ppm et 4,90 ppm, alignés avec $-\text{H}$ (rhamnose). Ces résultats valident la production d'un biosurfactant de type glycolipide avec une partie hydrophobe (acides gras) et une partie hydrophile (monosaccharide ou disaccharide de rhamnose) [14,37,408,503]. Le spectre RMN du carbone (^{13}C) (Fig. 25b) révèle des signaux caractéristiques à 171 ppm, correspondant aux carbones esters $-\text{COO}-$. La région 60–75 ppm indique la présence de carbones liés à des fonctions alcool ($\text{C}-\text{OH}$), typiques du noyau rhamnose. De plus, la présence de signaux à 129–130 ppm suggère une insaturation ($\text{C}=\text{C}$) dans certaines chaînes acyles. Enfin, les signaux dans la région 14–40 ppm confirment la nature aliphatique des chaînes hydrophobes. Ces données structurales sont cohérentes avec un biosurfactant de type rhamnolipide [408].

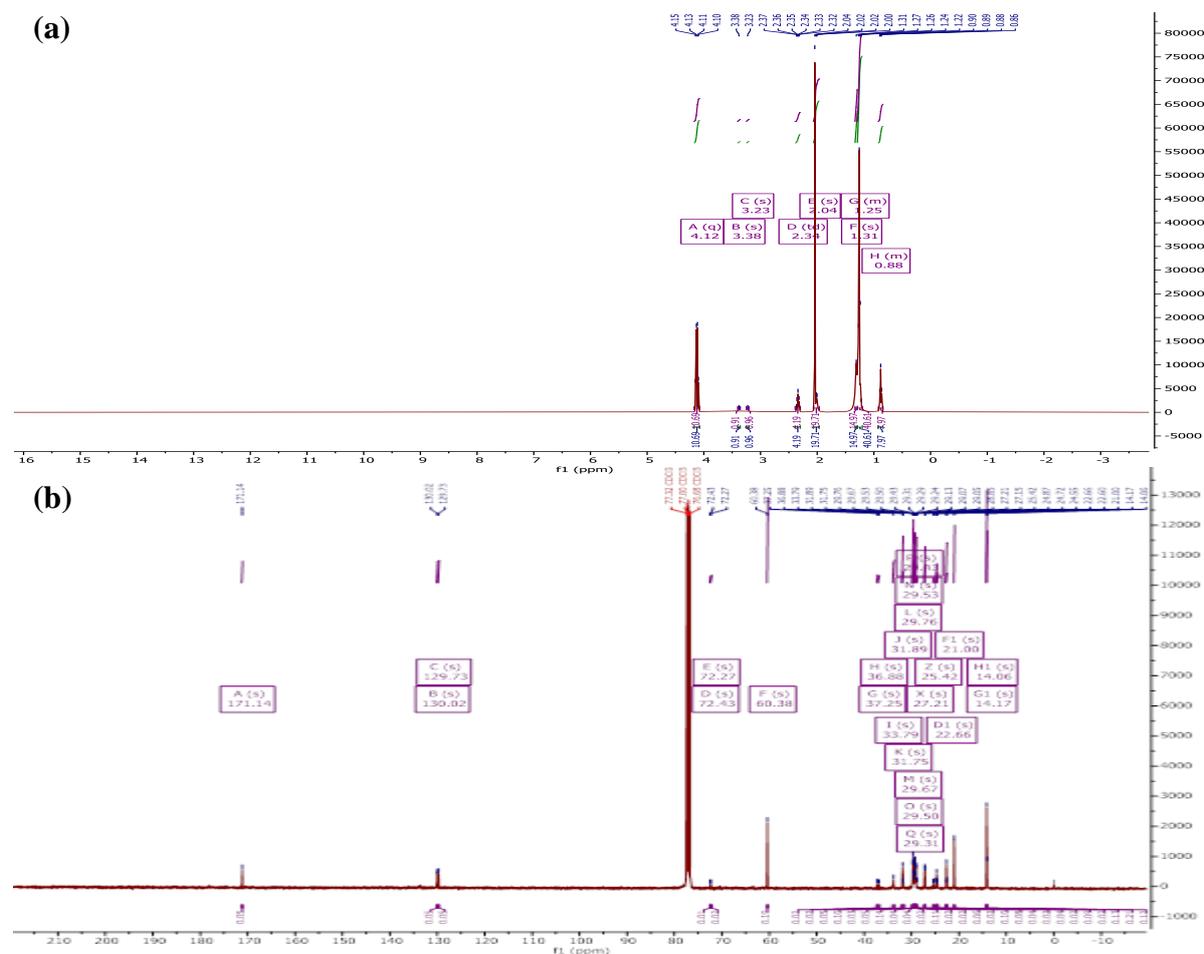


Figure 25 : Spectres RMN du rhamnolipide brut Rhl-BSP4 : (a) RMN ^1H et (b) RMN ^{13}C .

2.3.2. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est un paramètre fondamental dans la science des tensioactifs, indiquant la concentration de molécules de tensioactifs nécessaires à la formation de

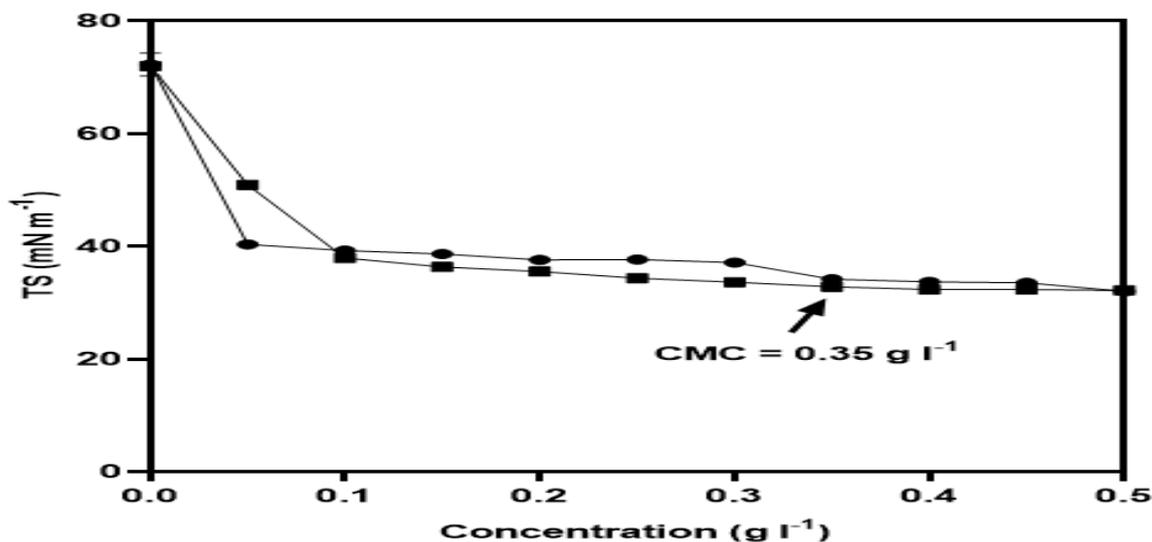


Figure 26 : Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) du rhamnolipide brut Rhl-BSP4.

micelles dans une solution. Comprendre la CMC est essentiel pour optimiser les applications des tensioactifs dans divers secteurs, tels que la récupération du pétrole et la bioremédiation. Dans ce contexte, le biosurfactant brut Rhl-BSP4, produit sur l'huile d'olive et sur l'huile de friture usée, était capable de diminuer la TS de l'eau de 72 à 32 mN m⁻¹ et de 72 à 34 mN m⁻¹, respectivement, démontrant son efficacité en tant que tensioactif. La Fig. 26 montre que la CMC de Rhl-BSP4 était de 350 mg m⁻¹, démontrant ainsi son potentiel tensioactif par rapport aux tensioactifs microbiens documentés dans la littérature existante.

En outre, le BS-BSP9 brut, produit sur milieu LB, a eu la capacité d'abaisser la TS de l'eau de 72,26 à 29,73 mN m⁻¹, prouvant son action comme tensioactif. La Fig. 27 montre que la CMC de BS-BSP9 était de 20 mg L⁻¹.

La détermination de la CMC des BS extraits est essentielle pour évaluer leur efficacité potentielle dans des applications pratiques. Sur la base de ce qui vient d'être démontré, il semble que le Rhl-BSP4 et le BS-BSP9 sont de bons candidats ou outils de bioremédiation.

Il a été démontré que la souche W10, de *P. aeruginosa*, a été reconnue pour sa capacité à produire des rhamnolipides sur 2% de glycérol, avec une valeur CMC de 80 mg L⁻¹ [350]. Par ailleurs, une valeur CMC de 400 mg L⁻¹ a été observée lorsque la souche W10 était cultivée en présence d'huile d'olive (2%, v/v), diminuant la TS de l'eau de 72 à 32,3 mN m⁻¹ [142]. Les mêmes valeurs CMC ont été rapportées [510]; par exemple, la capacité des BS sécrétées par *Pseudomonas* sp. DYNA270 permet d'abaisser la TS de l'eau à 22 mN m⁻¹, avec une valeur CMC de 20 mg L⁻¹. En outre, la souche NAPH6 de *P. aeruginosa* a démontré sa capacité à

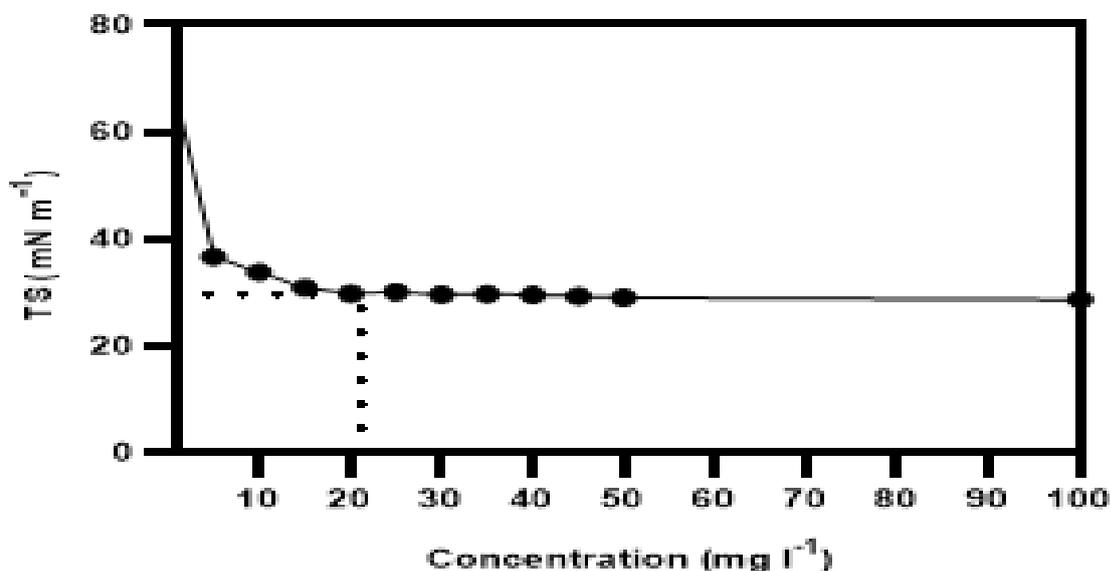


Figure 27 : Détermination de la concentration micellaire critique (CMC) du rhamnolipide brut BS-BSP9.

produire du BS lorsqu'elle est cultivée sur de l'huile de friture résiduelle, diminuant la TS de l'eau de 72 à 30 mN m⁻¹ avec une valeur de 200 mg L⁻¹ de CMC [9]. Par ailleurs, *Pseudomonas* sp. LGMS7 a enregistré une valeur CMC de 800 mg L⁻¹, croissante sur glycérol (2%, v/v), abaissant la TS du milieu à environ 30 mN m⁻¹

[14]. Nos résultats étaient relativement cohérents ou plus efficaces que certains autres BS documentés dans la littérature en raison de ses valeurs CMC inférieures. La CMC des BS s'étend entre 1 et 2000 mg L⁻¹, et un BS efficace peut abaisser la TS de l'eau de 72 à 35 mN m⁻¹ [315].

2.3.3. Stabilité des biosurfactants *vis-à-vis* de la salinité, de la température et du pH

L'efficacité des fonctions des BSs est affectée par de nombreuses variables environnementales. À cet égard, la tolérance des BSs Rhl-BSP4 et BS-BSP9 à divers stress environnementaux a été étudiée. L'évaluation de la stabilité du surnageant filtré des cultures des souches BSP4 et BSP9, cultivées respectivement sur de l'huile de friture usée et du milieu LB, a été réalisée dans diverses conditions de salinité, de température et de pH, guidée par le TDH et la TS.

2.3.3.1. Stabilité *vis-à-vis* de la salinité

Nos résultats ont indiqué que Rhl-BSP4 était stable sous une variation de salinité (2–12%), la TS et le TDH restent presque constants dans diverses concentrations de salinité (TS = 27 mN m⁻¹; TDH = 69 mm). Pareillement, BS-BSP9 a démontré une stabilité exceptionnelle sur une large plage de concentrations de NaCl (2–10%) (TS = 30 à 31 mN m⁻¹; TDH = 70.5 à 74.3 mm) (Fig. 28). De França et *al.* [511] a indiqué que la concentration élevée en sel peut modifier la forme des micelles, influençant ainsi les fonctions tensioactives des BSs.

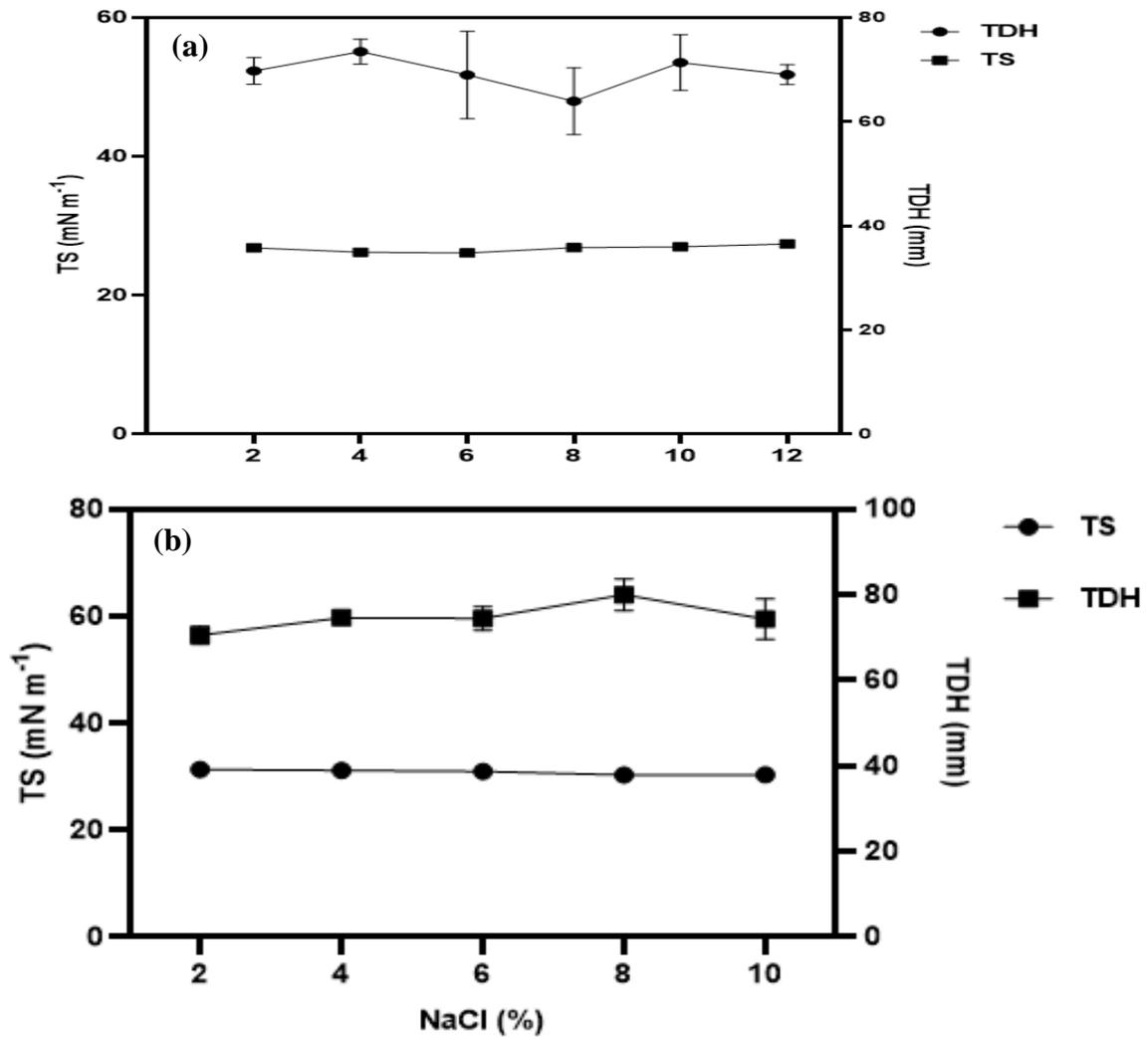


Figure 28 : Effet de la concentration de NaCl sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).

2.3.3.2. Stabilité vis-à-vis de la température

De plus, les BSs Rhl-BSP4 et BS-BSP9 se sont révélés *thermostables vis-à-vis* d'une large plage de température (−80–120 °C) comme montre la Fig. 29. Il en ressort que la congélation ou le chauffage des surnageants n'a pas affecté les performances des BSs. La TS et le TDH restent stables pendant la congélation à −80 °C pour Rhl-BSP4 (TS = 30,13 mN m^{−1}; TDH = 75,62 mm), et pour BS-BSP9 (TS = 34,1 mN m^{−1}; TDH = 74,53 mm).

Il a été constaté qu'une stabilité des BSs lorsqu'ils ont subis une réfrigération à 4 °C, soit pour BS-BSP9 (TS = 30,2 mN m^{−1}; TDH = 74,33 mm), ou pour BS-BSP9 (TS = 33,7 mN m^{−1}; TDH = 77,3 mm).

Quant au chauffage, il en ressort que ce dernier n'a exercé aucune influence sur la performance du Rhl-BSP4 (TS = 30,13 mN m^{−1}; TDH = 75,76 mm), et du BS-BSP9 (TS = 33,3 mN m^{−1}; TDH = 73,1 mm). Même, l'autoclavage n'a pas

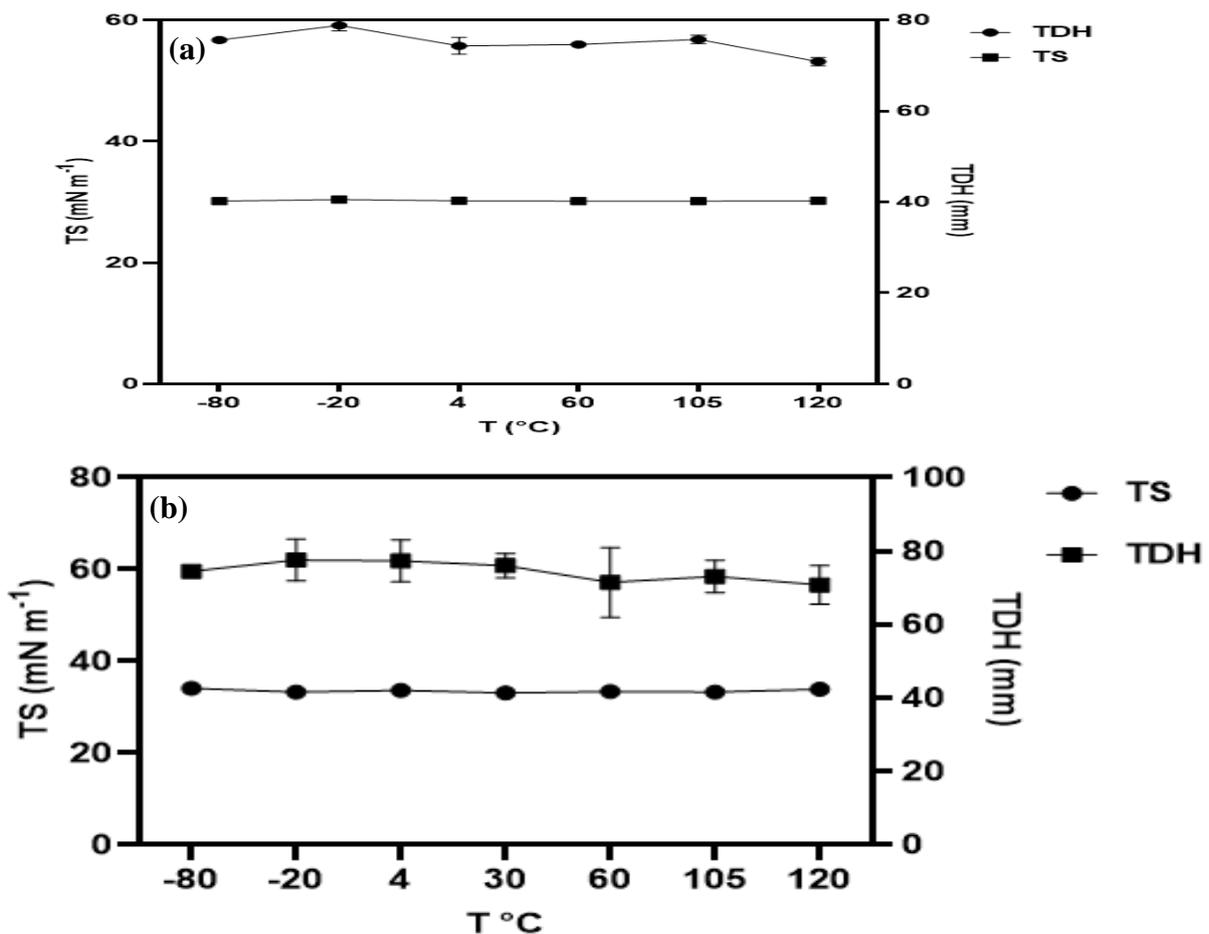


Figure 29 : Effet de la température sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).

réduit l'activité du Rhl-BSP4 (TS = 30,2 mN m⁻¹; TDH = 70,86 mm), et du BS-BSP9 (TS = 33,9 mN m⁻¹; TDH = 70,8 mm).

2.3.3.3. Stabilité vis-à-vis du pH

L'étude de la tolérance des BSs Rhl-BSP4 et BS-BSP9 en fonction du pH n'a montré aucun effet significatif sur la TS et le TDH du surnageant, entre pH 2 (TS = 28,8 mN m⁻¹) et pH 12 (TS = 29,06 mN m⁻¹) pour Rhl-BSP4, entre pH 2 (TS = 28,53 mN m⁻¹) et pH 12 (TS = 33,43 mN m⁻¹) pour BS-BSP9. Le diamètre de la zone claire est resté également élevé pendant des pH variables, pour Rhl-BSP4 (TDH = 63,1 mm à pH 2 et 78,39 mm à pH 12), et pour BS-BSP9 (TDH = 59,6 mm à pH 2 et 75,46 mm à pH 12). Il a été suggéré que les rhamnolipides produits par les espèces *Pseudomonas* ont tendance à précipiter à faible pH [512], ce qui explique la légère réduction du TDH à pH 2 (Fig. 30).

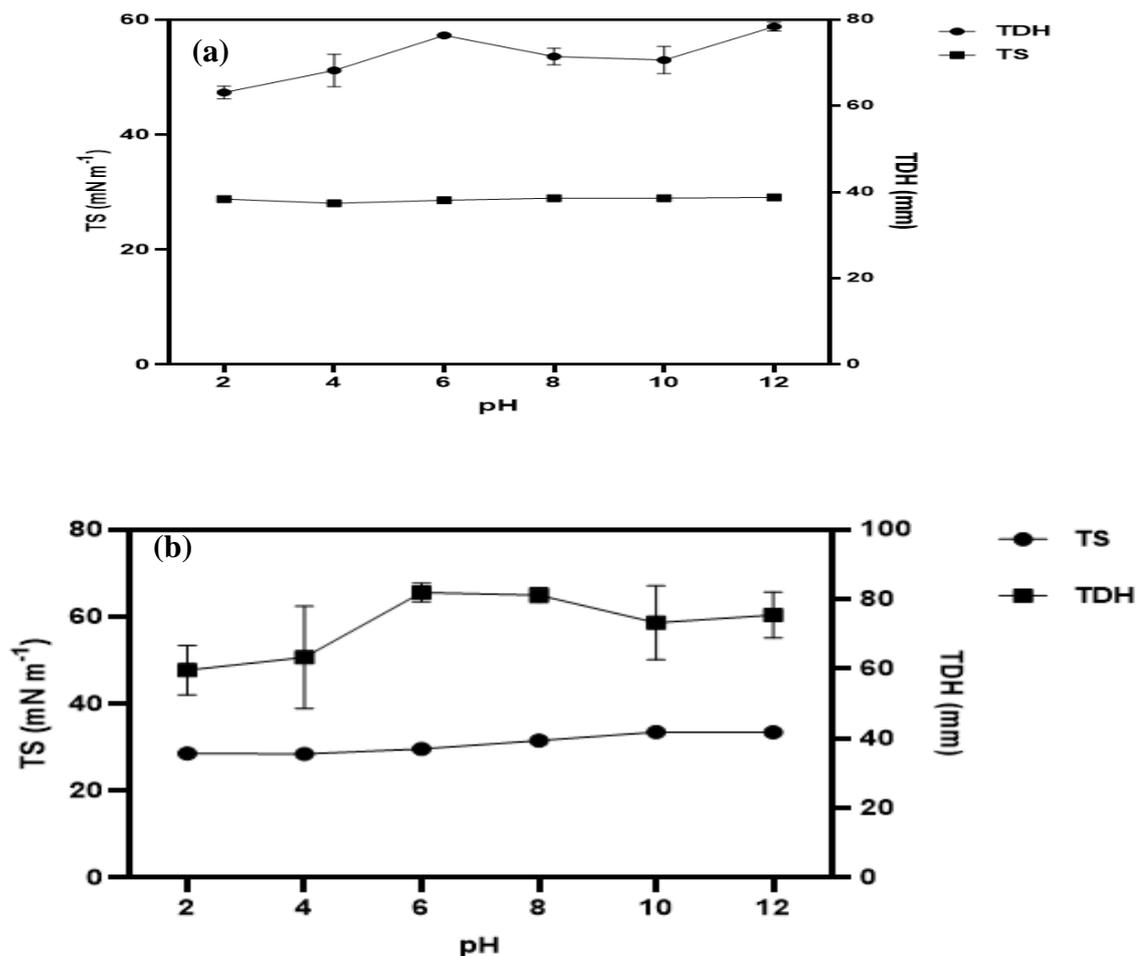


Figure 30 : Effet du pH sur l'efficacité de biosurfactants Rhl-BSP4 (a) et BS-BSP9 (b).

Il est important de noter que l'adaptabilité impressionnante des BSs isolés à différentes conditions environnementales suggère son applicabilité potentielle dans des conditions opérationnelles extrêmes, notamment dans les opérations industrielles et le nettoyage de sites contaminés par le pétrole.

Des résultats comparables ont été observés pour les BSs sécrétés par la souche NAPH6 de *P. aeruginosa*, qui se sont révélés stables à différentes salinités (0 à 30%), températures (4 à 121 °C) et pH (2,2 à 12) [9]. De plus, Chaida et *al.* a affirmé que les rhamnolipides synthétisés par *Pseudomonas* sp. LGMS7 ont atteint une stabilité notable contre la salinité (0 à 15%), la température (-20 à 121 °C) et le pH (2 à 12) [14]. De plus, les BS produits par une dégradative du pétrole, *Pseudomonas* sp. S2WE, étaient remarquablement fiables dans divers facteurs environnementaux, notamment des températures allant de 4 °C à 121 °C, des niveaux de pH de 3 à 10 et des concentrations de NaCl de 1% à 9% [508].

3. Etude des potentialités bio dégradatives des bactéries sélectionnées

3.1. Biodégradation du naphtalène par la souche BSP4

La biodégradation du naphtalène par la souche BSP4 de *P. aeruginosa* a été effectuée à 200 mg L⁻¹, dans le milieu Bushnell Haas. La Fig. 31 montre les résultats de l'évaluation du potentiel de l'isolat BSP4 à métaboliser le naphtalène à 150 tr/min et à 30 °C. Cette évaluation a été achevée en mesurant la DO à 600 nm. La croissance bactérienne maximale, atteignant $0,518 \pm 0,006$, a été obtenue après 24 h.

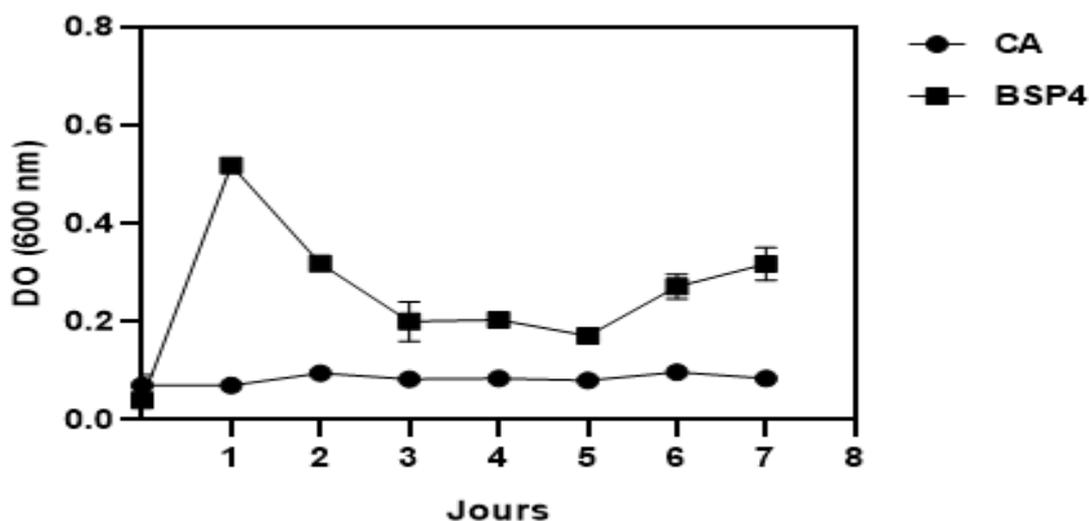


Figure 31 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP4 dans le milieu BH contenant du naphtalène (200 mg L⁻¹) à 150 tr/min et 30 °C, en comparaison avec témoin abiotique (CA), par mesure de DO à 600 nm.

De plus, les profils de GC-MS, présentés sur la Fig. 32, ont révélé que la souche BSP4 pouvait dégrader 97% des 200 mg L⁻¹ de naphtalène, après une période d'incubation de 7 jours.

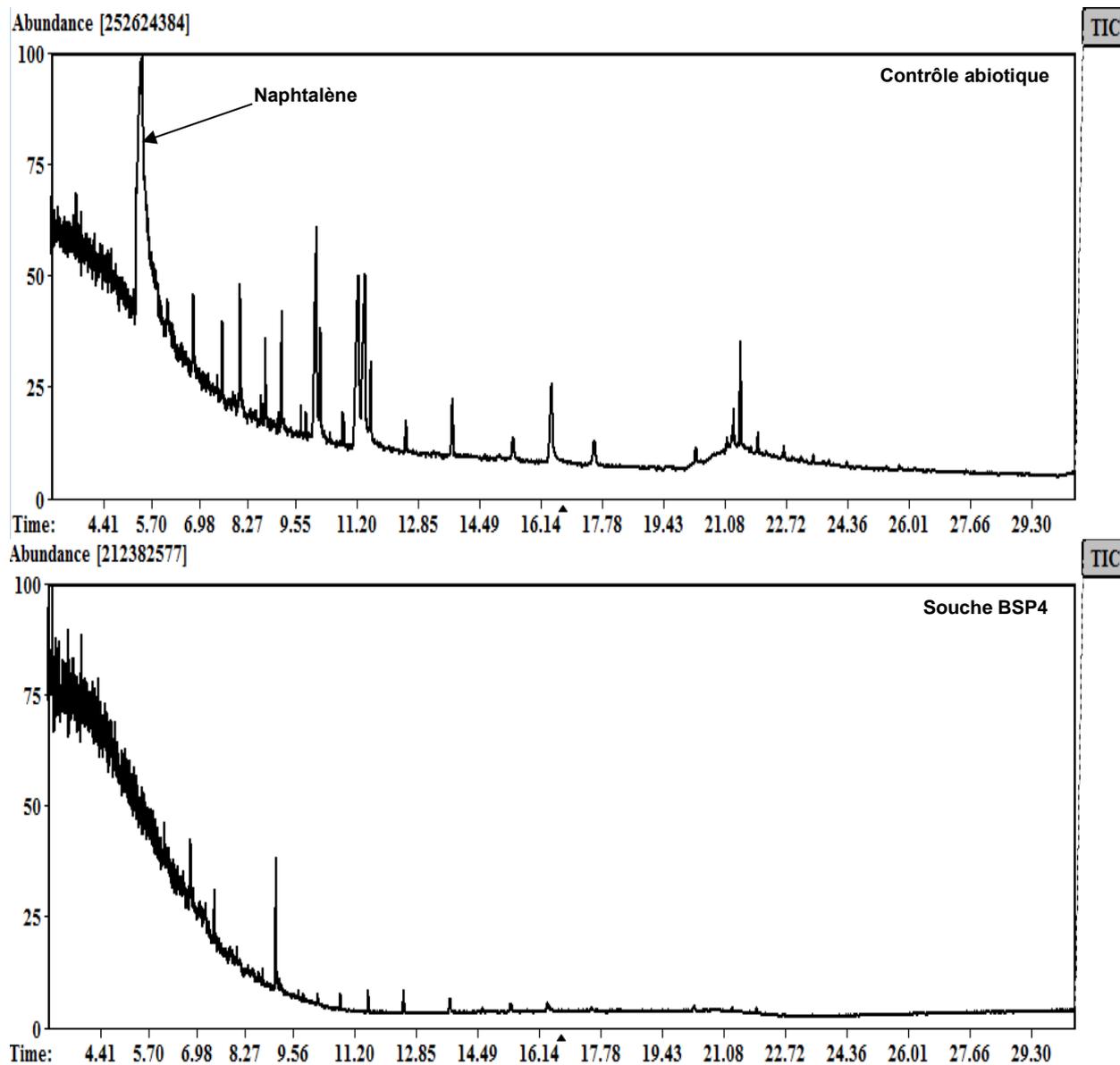


Figure 32 : Profils GC-MS des résidus de naphtalène dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP4 à 150 tr/min et 30 °C, pendant 7 jours, par rapport au témoin abiotique.

3.2. Biodégradation des HAPs par la souche BSP9

La biodégradation des HAPs par la souche BSP9 a été réalisée à 200 mg L⁻¹, en milieu basal (MB). La Fig. 33 met en évidence les résultats de l'évaluation du potentiel de l'isolat BSP9 à métaboliser le naphthalène (Fig. 33a), le phénanthrène (Fig. 33b) et le fluoranthène (Fig. 33c), à 150 tr/min et 37 °C. L'évaluation a été réalisée en mesurant la DO à 600 nm et la TS.

La croissance bactérienne maximale, atteignant $0,492 \pm 0,005$, $0,622 \pm 0,001$ et $0,498 \pm 0,005$, a été obtenue sur le naphthalène, le phénanthrène et le fluoranthène, après 7, 5 et 3 jours, respectivement. Simultanément, la TS du milieu a réduit jusqu'à $48,50 \pm 0,20$ mN m⁻¹, $28,86 \pm 0,11$ mN m⁻¹ et $30,66 \pm 0,41$ mN m⁻¹, après 2, 3 et 3 jours d'incubation, lorsque la souche BSP9 poussaient respectivement sur du naphthalène, du phénanthrène et du fluoranthène.

Notamment, les profils GC-FID, présentés dans la Fig. 34, la Fig. 35 et la Fig. 36, ont révélé que la souche BSP9 pouvait dégrader 83,25% de 200 mg L⁻¹ de naphthalène après une période d'incubation de 3 jours, 27,7% et 68,33% de 200 mg L⁻¹ de phénanthrène, et 200 mg L⁻¹ de fluoranthène, respectivement, après une période d'incubation de 7 jours.

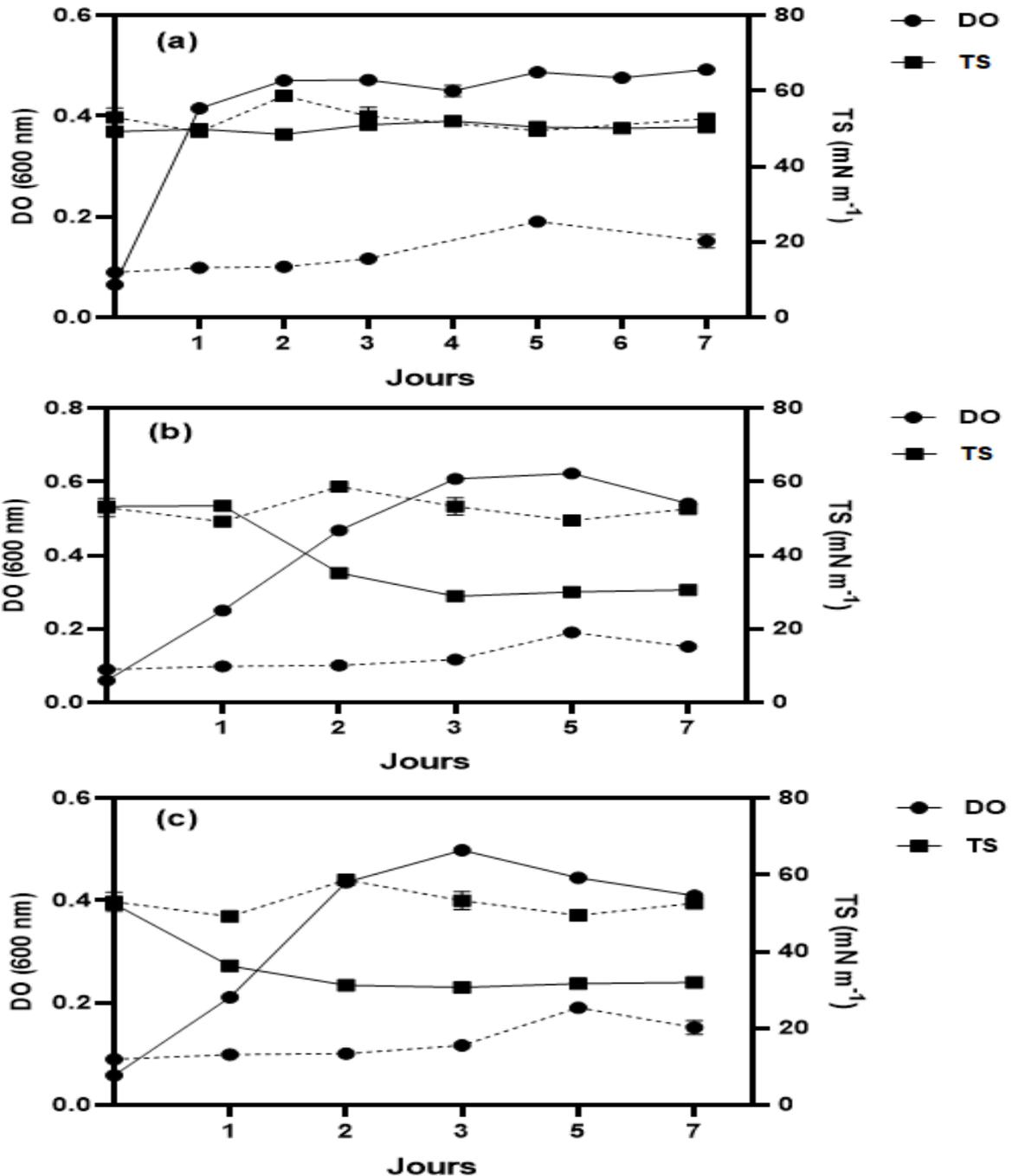


Figure 33 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP9 (ligne continue) sur un milieu basal contenant 200 mg L⁻¹ de (a) naphthalène, (b) phénanthrène, et (c) fluoranthène, à 37 °C et 150 tr/min, par mesure de densité optique (DO) à 600 nm et de tension de surface (TS), par rapport au témoin biologique (ligne discontinue).

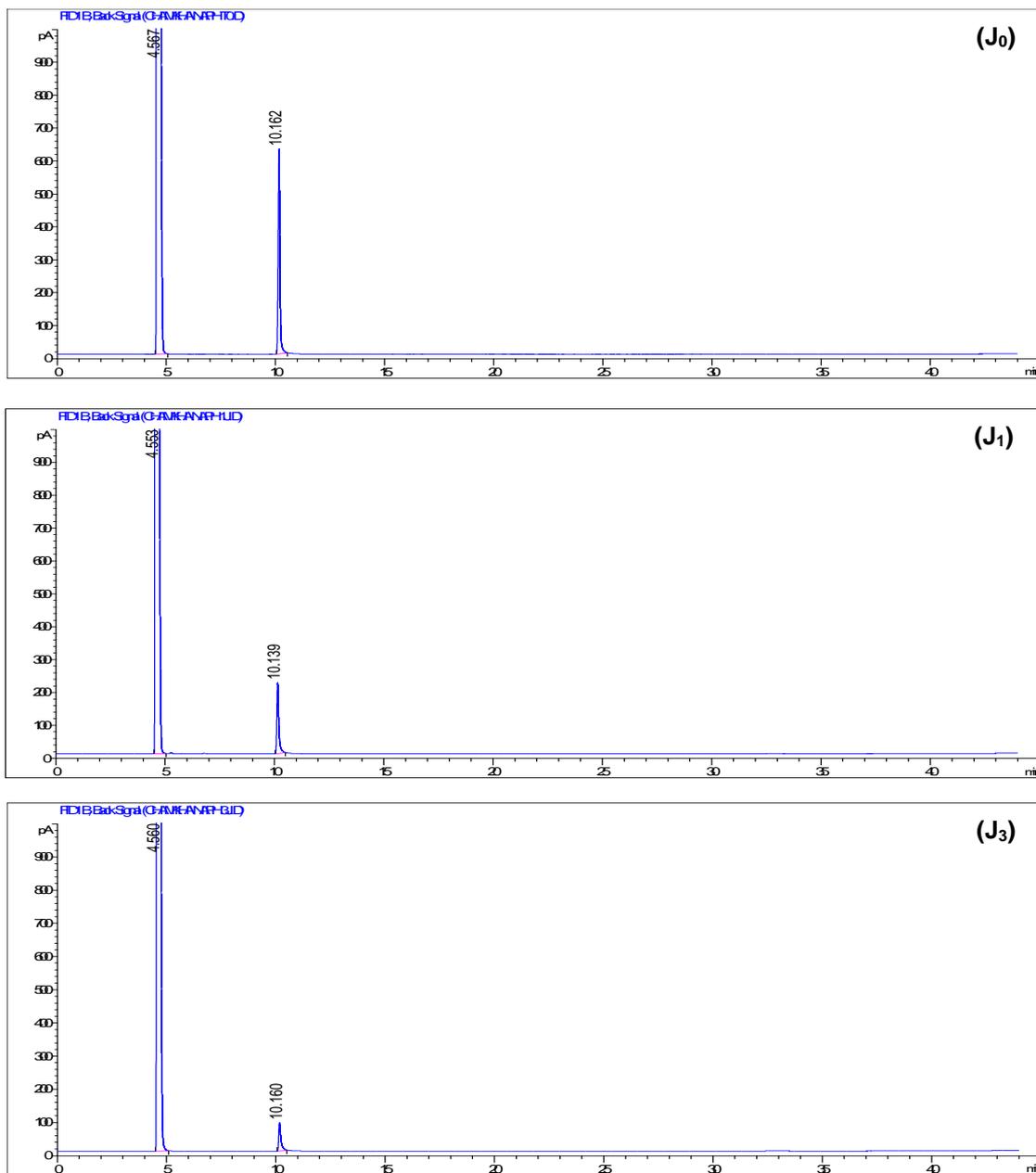


Figure 34 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du naphthalène (200 mg L⁻¹) par la souche BSP9, à 37 °C et 150 tr / min, en fonction du temps (0, 1 et 3 jours).

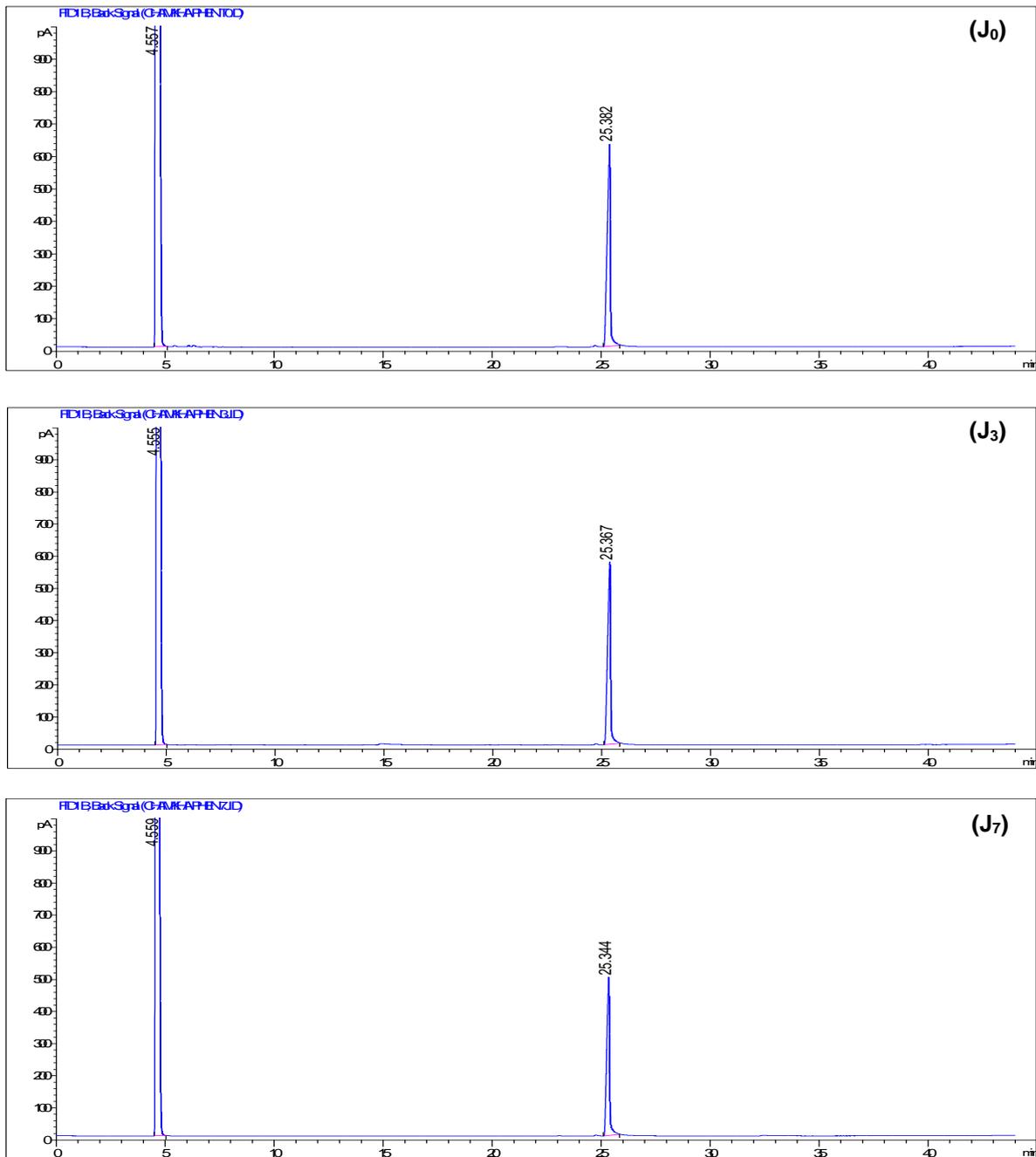


Figure 35 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du phénanthrène (200 mg L^{-1}) par la souche BSP9, à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et 150 tr/min , en fonction du temps (0, 3 et 7 jours).

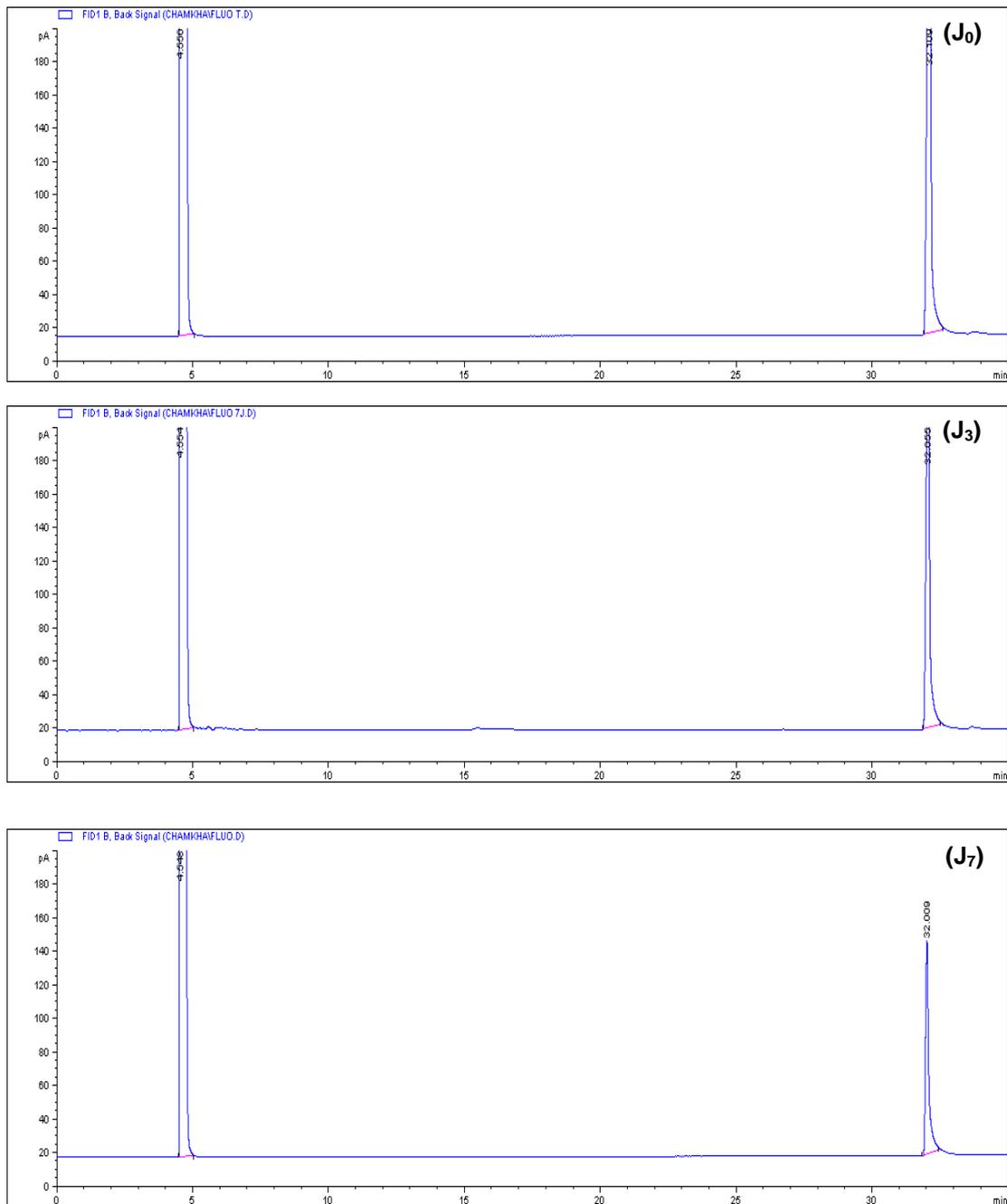


Figure 36 : Les chromatogrammes GC-FID pendant la biodégradation du fluoranthène (200 mg L^{-1}) par la souche BSP9, à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et 150 tr/min , en fonction du temps (0, 3 et 7 jours).

Les souches BSP4 et BSP9 pourraient constituer une solution efficace pour les stratégies de bioremédiation à venir visant à réduire la présence de contaminants persistants dans les zones polluées. Contrairement aux recherches antérieures sur le même sujet, les souches sélectionnées ont montré une grande efficacité dans la biodégradation des HAPs avec de courtes périodes. Récemment, une souche W10 de *P. aeruginosa* dégradant le phénanthrène a montré une capacité aventureuse à dégrader 80% de phénanthrène après un mois d'incubation à 37 °C [142]. De même, la souche NAPH6 de *P. aeruginosa* pourrait métaboliser 98% du NAPH (200 mg L⁻¹) en 7 jours [9]. En termes de biodégradation du fluoranthène, *Pseudomonas* sp. Le PSA5 a démontré une dégradation significative, dépassant 61% de la concentration de 200 mg L⁻¹ pendant 10 jours [513]. D'autres bactéries productrices de BS, telles que *B. licheniformis* JUG GS2 et *B. sonorensis* JUG RS2, qui métabolisent respectivement 48% et 29% du naphthalène (200 mg L⁻¹), après une période d'incubation de 7 jours [514]. Une *B. stratosphericus* FLU5 marine halotolérante pourrait dégrader environ 45% du fluoranthène (100 mg L⁻¹), en 30 jours [515].

La biodégradation des HAPs se produit de manière aérobie et anaérobie, la plupart des micro-organismes dégradant les HAPs dans des conditions strictement aérobies [8]. La dégradation aérobie est facilitée par les enzymes mono- et di oxygénases, responsables de la rupture des anneaux [8]. Il s'agit de la transformation des HAPs en intermédiaires dans l'existence de l'oxygène, impliquant de multiples bactéries. Des voies métaboliques pour divers HAPs, quel que soit leur poids moléculaire, ont été suggérées [129]. Bien que le processus fondamental du catabolisme aérobie soit similaire pour toutes les bactéries dégradant les HAPs, les intermédiaires et produits finaux spécifiques varient d'une souche bactérienne à l'autre. Dans la première étape de ce processus, une molécule de HAPs est oxydée pour former un dihydrodiol grâce à un système enzymatique à plusieurs composants qui incorpore de l'oxygène moléculaire dans le noyau du HAP [130]. Certaines études ont également suggéré la participation de la di oxygénase ou de la di oxygénase d'hydroxylation du cycle aromatique dans l'apport d'oxygène au cycle benzénique des HAPs [8,124,131]. Les intermédiaires déshydratés résultant de cette oxydation peuvent alors suivre soit des voies d'*ortho-clivage*, soit des voies de *méta-clivage*, pour être finalement convertis en intermédiaires du cycle de l'acide

tricarboxylique [132]. L'*ortho-clivage* fait référence au processus de rupture du cycle aromatique entre les atomes de carbone portant des groupes hydroxyle, conduisant à la formation d'acides dicarboxyliques aromatiques [133]. Alternativement, le *métabolisme* a lieu au niveau d'une autre liaison carbone-carbone, produisant des acides aromatiques monocarboxyliques et, dans certains cas, de l'acide 2-céto-3-butérique. Ce dernier est ensuite transformé en pyruvate et en un dérivé du HAPs comportant un cycle en moins [133]. Les bactéries dotées d'activités enzymatiques appropriées clivent séquentiellement tous les anneaux de la molécule HAPs, entraînant la formation de composés métaboliques centraux. Il convient de noter que les chemins de dégradation des différents HAP convergent à certaines étapes mais diffèrent principalement dans les réactions initiales [133].

Tableau 12 : Comparaison de dégradation des HAPs par BSP4 et BSP9 avec peu d'autres souches bactériennes rapportées.

Souches	Type de HAP	Concentration initiale de HAP (mg L ⁻¹)	Période d'incubation (Jours)	DO (600 _{nm})	Biodégradation (%)	Références
<i>P. aeruginosa</i> BSP4	NAP	200	7	0,518	97	Cette étude
<i>P. aeruginosa</i> BSP9	NAP	200	3	0,492	83,25	
	PHE	200	7	0,622	27,7	
<i>P. aeruginosa</i> PSA5	FLU	200	7	0,498	68,33	[513]
	FLU	200	10	Nd	61	
<i>Rhodococcus</i> sp. NJ2	FLU	200	10	Nd	74	
Consortium (<i>P. aeruginosa</i> PSA5 + <i>Rhodococcus</i> sp. NJ2)	FLU	200	10	Nd	97	
<i>B. stratospherics</i> FLU5	FLU	100	30	0,58	45	[515]

<i>P. aeruginosa</i> W10	PHE	200	30	0,42	80	[142]
<i>Halomonas sp.</i> Cnaph3	NAP	200	7	0,8	98,8	[15]
<i>Halomonas venusta</i> PHKT	PHE	200	30	0,65	90,26	
<i>B. licheniformis</i> JUG GS2	NAP	200	7	0,084	48	[514]
<i>B. sonorensis</i> JUG RS2 (3)	NAP		7	0,361	29	
<i>Pseudomonas sp.</i> NAPH6	NAP	200	7	0,65	98	[9]
<i>Pseudomonas sp.</i> SA3	NAP	500	4	Nd	98,74	[35]
<i>P. aeruginosa</i> SR17	NAP	3000	5	1,04	89,2	[516]

HAPs: Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; DO: Densité optique ; NAP: Naphtalène ; PHE: Phénanthrène ; FLU: Fluoranthène ; Nd : non déterminé.

3.3. Biodégradation du pétrole brut par la souche BSP4

La biodégradation du pétrole brut par la souche BSP4 de *P. aeruginosa* a été réalisée à 1% (v/v), respectivement, dans le milieu Bushnell Haas.

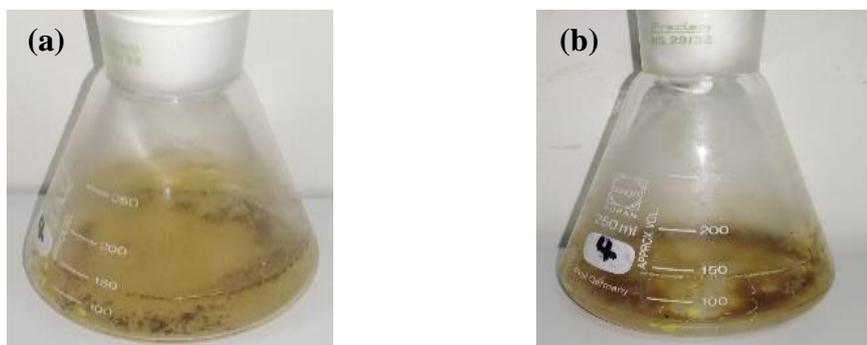


Figure 37 : Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v) par la souche BSP4 (a), à 30 °C, après 21 jours d'incubation, en comparaison avec un témoin abiotique (b)

Fig. 37 met en évidence les résultats de l'évaluation du potentiel de métabolisation de l'isolat BSP4 et du pétrole brut à 150 tr/min et 30 °C. Cette évaluation a été réalisée en mesurant la DO à 600 nm. La croissance bactérienne maximale, atteignant $0,556 \pm 0,017$, a été obtenue après 21 jours Fig. 38.

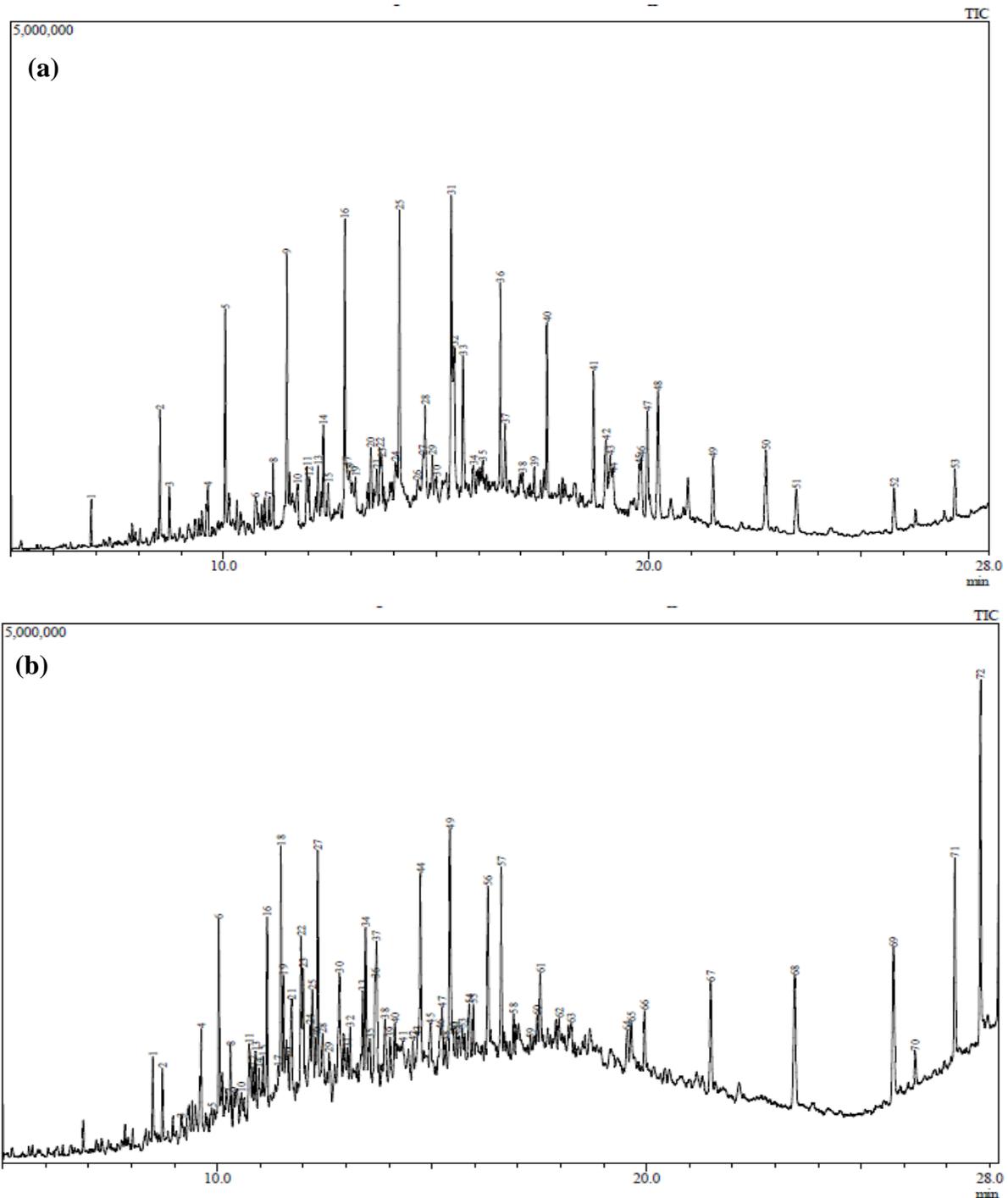


Figure 38 : Profils GC-MS des résidus de pétrole brut dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP4 (a) à 150 tr/min et 30 °C, pendant 7 jours, par rapport au témoin abiotique (b).

La Fig. 38, qui présente les graphes GC-MS de la biodégradation du pétrole brut, montre que BSP4 est capable de métaboliser les *n*-alcanes (*n*C12-*n*C35) du pétrole brut, avec un taux de biodégradation supérieur à 83% pour l'heptadécane, 69% pour l'hexadécane et 57% pour l'éicosane et le dotriacontane après 21 jours d'incubation (tableau 14).

Tableau 13 : Efficacité de biodégradation de *P. aeruginosa* BSP4 cultivé dans un milieu Bushnell Haas enrichi avec du pétrole brut à 1% (v/v) après incubation à 150 tr/min et 30 °C, pendant 21 jours.

Composé	Masse moléculaire (g mol ⁻¹)	Formule chimique brute	Temps de rétention (min)	Aire de pic		Pourcentage de biodégradation (%)
				Témoin abiotique	Échantillon d'essai	
Dodécane	170	C ₁₂ H ₂₆	8.499	1964261	1223316	37.72
Tridécane	184	C ₁₃ H ₂₈	10.038	3402867	2971179	12.68
Tétradécane	198	C ₁₄ H ₃₀	11.486	4346928	4137065	4.82
Pentadécane	212	C ₁₅ H ₃₂	12.849	5727548	4154930	27.45
Hexadécane	226	C ₁₆ H ₃₄	14.136	4918267	1484108	69.82
Heptadécane	240	C ₁₇ H ₃₆	15.355	6768289	1088702	83.91
Eicosane	282	C ₂₀ H ₄₂	17.608	3065295	1317610	57.01
Dotriacontane	450	C ₃₂ H ₆₆	19.970	2467492	1060896	57

3.4. Biodégradation du pétrole brut par la souche BSP9

La biodégradation du pétrole brut par la souche BSP9 a été réalisée à 1% (v/v) dans le milieu de base.

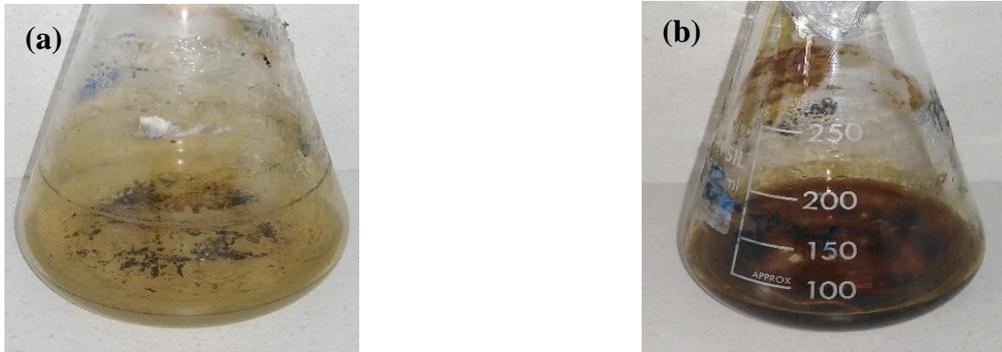


Figure 39 : Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v) par la souche BSP9 (a), à 37 °C, après 10 jours d'incubation, en comparaison avec un témoin abiotique (b).

La Fig. 39 met en évidence les résultats de l'évaluation du potentiel de l'isolat BSP9 à métaboliser le pétrole brut à 150 tr/min et à 37 °C. L'évaluation a été réalisée en mesurant la DO à 600 nm et la TS. La croissance bactérienne maximale, atteignant $0,493 \pm 0,001$, a été obtenue après 10 jours. Simultanément, la TS du milieu a diminué jusqu'à $42,33 \pm 0,64 \text{ mN m}^{-1}$, après 7 jours d'incubation (Fig. 40).

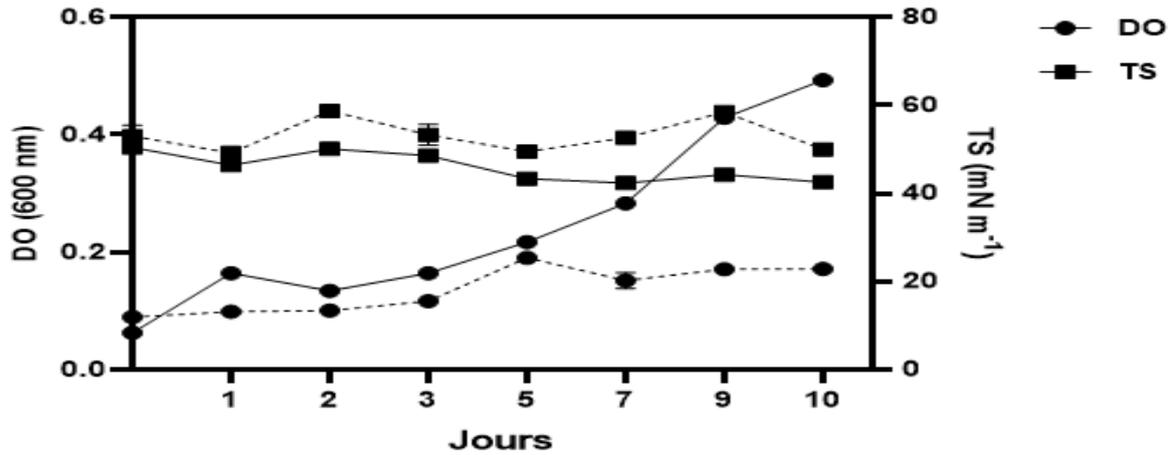


Figure 40 : Étude de la cinétique de croissance de la souche BSP9 (ligne continue) sur un milieu basal contenant 1% de pétrole brut, à 37 °C et 150 tr/min, par mesure de densité optique (DO) à 600 nm et de tension de surface (TS), par rapport au contrôle biologique (ligne discontinue).

Les graphes GC-MS de biodégradation du pétrole brut ont montré que BSP9 était capable de métaboliser les *n*-alcanes du pétrole brut, avec un taux de biodégradation atteignant 86,28% après 10 jours d'incubation (Fig.41).

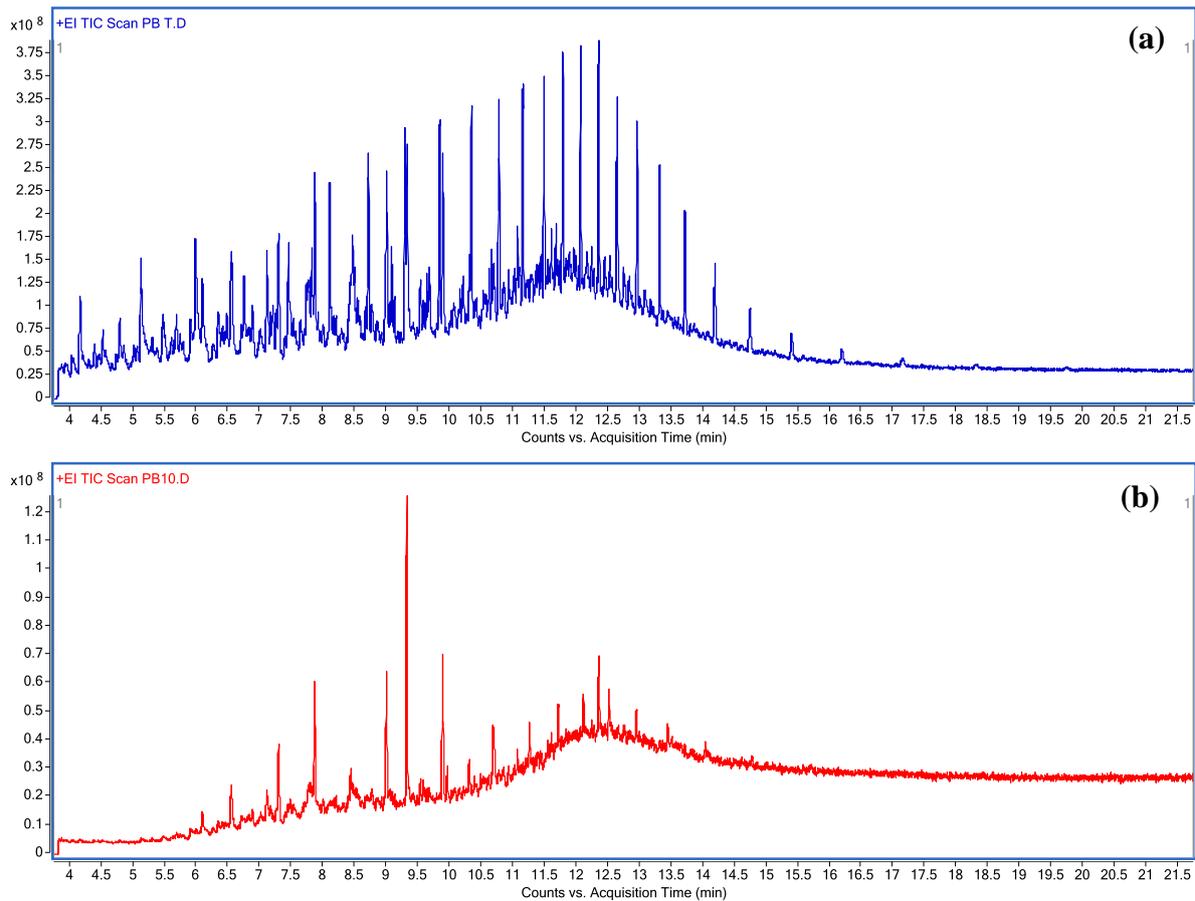


Figure 41 : Profils GC-MS des résidus de pétrole brut dans le milieu BH après incubation avec la souche BSP9 (b) à 150 tr/min et 37 °C, pendant 10 jours, par rapport au témoin abiotique (a).

Les souches BSP4 et BSP9 ont montré une grande efficacité dans la biodégradation du pétrole brut. Récemment, *P. aeruginosa* W10 une souche dégradante a montré une capacité intrigante à dégrader 99 % du pétrole brut après un mois d'incubation à 37 °C [142]. De même, la souche NAPH6 de *P. aeruginosa* pourrait métaboliser 96,2 % des n-alcanes présents dans le pétrole brut (1 %, v/v) en 20 jours [9]. En outre, Abdelkrim (2022) a souligné la haute efficacité de biodégradation du pétrole brut (98,5%) par la souche indigène *Pseudomonas* sp. souche LGMS7, en 27 jours à 25 °C et 150 tr/min [517]. De plus, il a été démontré que la souche PP3 de *P. aeruginosa* dégrade de manière significative 78% du pétrole brut à pH = 7, en 15 jours [518].

Diverses bactéries peuvent dégrader les hydrocarbures et produire des BS lorsqu'elles utilisent des n-alcanes comme seule source de carbone. Ils ont la capacité d'assimiler et de véhiculer des alcanes solubles à l'état liquide car ils ne

peuvent utiliser que des hydrocarbures solubilisés [145]. Le processus de biodégradation aliphatique diffère de celui des composés aromatiques ; l'idée générale est que la dégradation de ces substances repose sur des microbes qui se développent dans des environnements contaminés par le pétrole et jouent un rôle crucial dans le traitement de ces polluants [146]. Les substances tensioactives telles que les BS peuvent augmenter la surface des substrats hydrophobes, améliorant ainsi leur biodisponibilité, ce qui stimule la croissance bactérienne et l'efficacité de la bioremédiation [145].

4. Potentialités bio dégradatives sur différents hydrocarbures

La capacité de croissance de la souche BSP9 sur différents hydrocarbures, comme seule source de carbone, en présence de milieu de base, a été étudiée. Le tableau 14 montre son développement de la bactérie BSP9 sur différents hydrocarbures comme seule source de carbone. La BSP9 a pu se développer sur la majorité des HAP étudiés et sur l'hydrocarbure complexe. Cependant, elle n'a pas réussi à se développer sur les alcanes. En ce qui concerne le groupe des BTEX, la souche BSP9 semble se développer exclusivement sur l'o-xylène. Cela suggère que la souche BSP9 possède un ensemble diversifié de mécanismes cataboliques capables de soutenir sa croissance sur différents hydrocarbures résilients *via* la production de BS. De même, une réduction significative de la TS a été observée lorsque la souche se développait sur des HAP et du pétrole brut.

Tableau 14 : Croissance de la souche BSP9 en présence de différents hydrocarbures.

Hydrocarbures		DO _{max} (600 nm)	Croissance de la souche BSP9	TS _i (mN m ⁻¹ ± SD)	TS _f (mN m ⁻¹ ± SD)
Monoaromatiques (1%, v/v)	Benzène	0.09 ± 0.00 (1 j)	–	49.13 ± 1	49.1 ± 0.4
	Toluène	0.07 ± 0.01 (1 j)	–	42.73 ± 0.64	49.9 ± 0.4
	Ethylbenzène	0.16 ± 0.01 (1 j)	–	47.76 ± 0.80	40.46 ± 0.94****
	<i>p</i> -xylène	0.11 ± 0.01 (1 j)	–	46.16 ± 1.10	41.1 ± 1****
	<i>o</i> -xylène	0.25 ± 0.01 (1 j)	+	55.93 ± 1.22	42.73 ± 1.41****
	<i>m</i> -xylène	0.08 ± 0.01 (2 j)	–	40.13 ± 0.11	46.23 ± 0.30****
HAPs (200 mg L ⁻¹)	Naphtalène	0.47 ± 0.00**** (3 j)	+	49.23 ± 0.3**	51.03 ± 0.64****
	Phénanthrène	0.6 ± 0.00**** (3 j)	++	53.26 ± 0.41	28.86 ± 0.11****
	Fluoranthène	0.49 ± 0.00**** (3 j)	+	52.43 ± 0.81	30.66 ± 0.41****
	Benzo[a]pyrène	0.69 ± 0.00**** (3 j)	++	59.83 ± 0.30****	39.96 ± 0.97****
Alcanes (1%, v/v)	Pentadécane	0.16 ± 0.00 (7 j)	–	43.53 ± 0.11****	42.53 ± 0.11****
	Octane	0.11 ± 0.00 (1 j)	–	40.8 ± 0.00****	36.73 ± 1.66****

	Décane	0.10 ± 0.00 (1 j)	-	42.66 ± 0.11****	42.13 ± 0.80****
Hydrocarbures complexe (1%, v/v)	Pétrole brut	0.28 ± 0.00**** (3 j)	+	50.36 ± 1.02	41.6 ± 0.00****

j jours; - DO_{600 nm} max < 0.2 (pas de croissance); + DO_{600 nm} max: 0.2–0.5 (croissance); ++ DO_{600 nm} max > 0.5 (croissance importante); DO_{600 nm} (Contrôle biotique) = 0.15 ± 0.01 (7 j); TS_i: Tension de surface initiale; TS_f: Tension de surface finale; TS_i (Contrôle biotique) = 52.96 ± 2.47 mN m⁻¹; TS_f (Contrôle biotique) = 52.63 ± 0.47 mN m⁻¹; SD Standard deviation. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois répétitions ± l'écart-type. L'astérisque indique p < 0,05 par rapport au contrôle biotique. (* < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 ; **** < 0.0001)

Dans ce contexte, il a été démontré qu'une souche BZ-3 de *Pseudomonas* était capable de se développer sur du xylène, de l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, de l'hexane, du NAPH, du PHE, de l'anthracène et du pyrène [190]. Chebbi et *al.* ont constaté que la souche W10 de *P. aeruginosa* présentait une capacité intrigante à se développer sur l'acide protocatéchuique, l'acide gentisique, les HAP, les hydrocarbures complexes et les huiles végétales en tant que sources exclusives de carbone et d'énergie. Cependant, elle ne s'est pas développée en présence d'octane et de BTEX [142]. La souche NAPH6 de *Pseudomonas* sp. était également capable d'utiliser des huiles végétales, du NAPH, des hydrocarbures complexes, de l'hexadécane et du glycérol comme sources exclusives de carbone et d'énergie [9].

5. Applications des biosurfactants

5.1. Activité antimicrobienne

Le besoin de nouvelles stratégies pour lutter contre les biofilms et les bactéries résistantes aux antibiotiques augmente. Une solution proposée implique l'intégration d'antibiotiques avec des agents tensioactifs tels que des biosurfactants, jetant potentiellement les bases d'une nouvelle voie d'agents antimicrobiens et offrant des alternatives aux antibiotiques traditionnels [519,520]. En conséquence, l'activité antimicrobienne de deux biosurfactants Rhl-BSP4, et BS-BSP9, a été examinée. Rhl-BSP4 a montré une activité antimicrobienne remarquable contre *C. albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, et *E. coli* ATCC 25922 à différentes concentrations (100%, 50% et 25%) (Fig. 42). L'activité antibactérienne la plus élevée a été observée contre la souche Gram-positive *S. aureus* ATCC 25923, avec un diamètre de zone d'inhibition de $37,66 \pm 0,2$ mm à la concentration élevée (100 % du rhamnolipide brut). Parmi les souches pathogènes testées, la plus faible activité a été observée contre la levure *C. albicans* ATCC 10231, avec un diamètre de zone d'inhibition de $30,8 \pm 0,3$ mm.

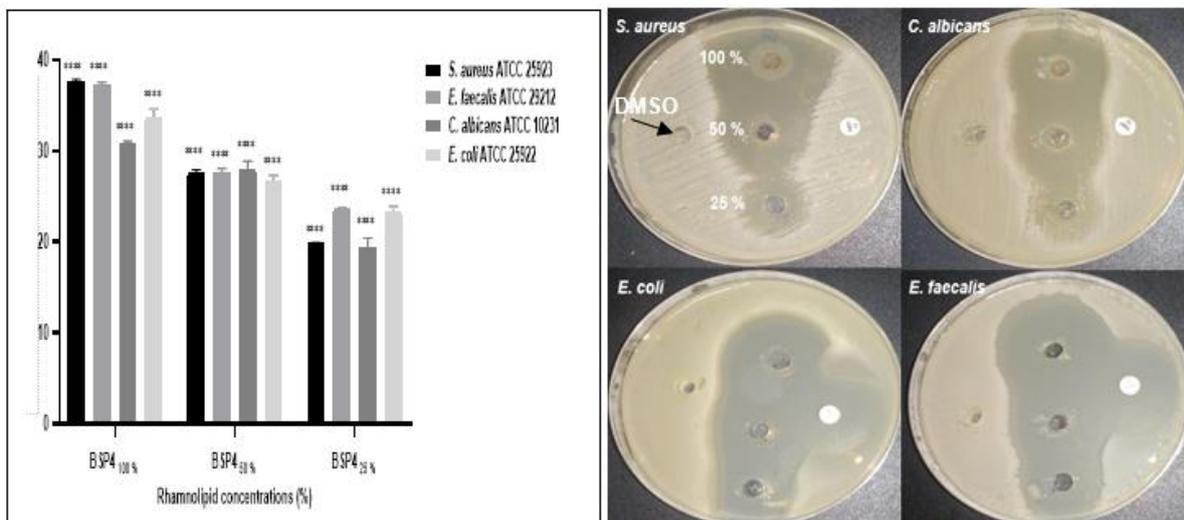


Figure 42 : Activité antimicrobienne du rhamnolipide Rhl-BSP4 *vis-à-vis* des souches pathogènes à différentes concentrations (100%, 50% et 25%), en utilisant le DMSO (à gauche), l'ampicilline et la gentamycine (à droite) comme témoins négatifs et positifs, respectivement. L'astérisque indique $p < 0,05$ par rapport au témoin négatif (DMSO). (**** $< 0,0001$).

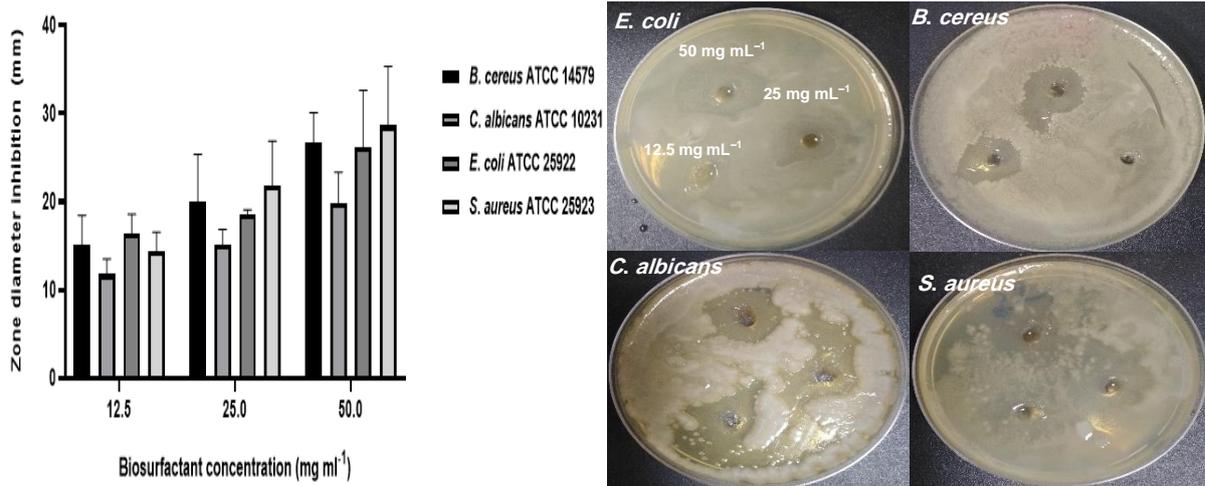


Figure 43 : Activité antimicrobienne du rhamnolipide BS-BSP9 *vis-à-vis* des souches pathogènes à différentes concentrations (50, 25 et 12,5 mg L⁻¹).

L'activité antimicrobienne de BS-BSP9 a été examinée (Fig. 43). il en ressort un résultat important contre *B. cereus* ATCC 14579, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 et *C. albicans* ATCC 10231 à différentes concentrations (50, 25 et 12,5 mg mL⁻¹). L'activité antibactérienne la plus élevée a été notée avec BS-BSP9 contre *S. aureus* ATCC 25923, avec une inhibition maximale du diamètre de zone de 28,63 ± 6,7 mm à la concentration élevée (50 mg mL⁻¹). Cependant, la plus faible activité a été observée contre la levure *C. albicans* ATCC 10231, avec un diamètre de zone d'inhibition maximal de 19,76 ± 3,6 mm à 50 mg mL⁻¹.

La détermination des CMI et des CMB est une étape cruciale dans l'évaluation de l'efficacité de tout agent antimicrobien. Dans nos investigations, les CMI ont été déterminées pour Rhl-BSP4 et BS-BSP9. Les CMI de Rhl-BSP4 variaient de 1,562 mg mL⁻¹ à 12,5 mg mL⁻¹ (Fig. 44). La faible valeur de MIC était contre *S. aureus* ATCC 25923, et la valeur élevée a été enregistrée contre *C. albicans* ATCC 10231.

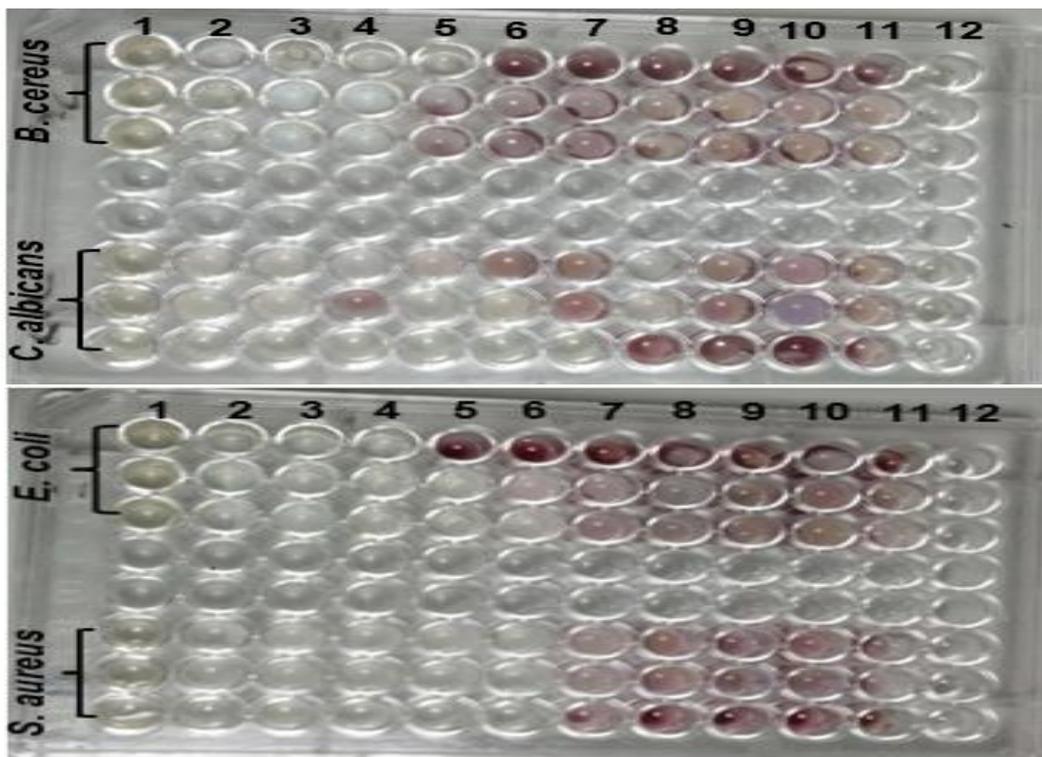


Figure 44 : Détermination de la CMI du rhamnolipide isolé Rhl-BSP4 contre quatre souches pathogènes. Après 24 h d'incubation, 20 μL de solution de colorant au chlorure de triphényltétrazolium (5 mg mL^{-1}) (TTC) ont été ajoutés à chaque puits. La colonne 12 confirme qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la préparation de la microplaque. La concentration la plus élevée incorporée dans la plaque était de 50 mg mL^{-1} (colonne 1) et la plus faible obtenue par double dilution en série était de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (colonne 11).

Les CMI de BS-BSP9 étaient cohérentes à $3,125 \text{ mg mL}^{-1}$ *vis-à-vis* de toutes les souches testées (Fig. 45). Toutefois, les CMB variaient de $6,25 \text{ mg mL}^{-1}$ à 25 mg mL^{-1} , la faible valeur a été observée contre *E. coli* ATCC 25922, et celle élevée a été enregistrée contre *S. aureus* ATCC 25923 et *C. albicans* ATCC 10231.

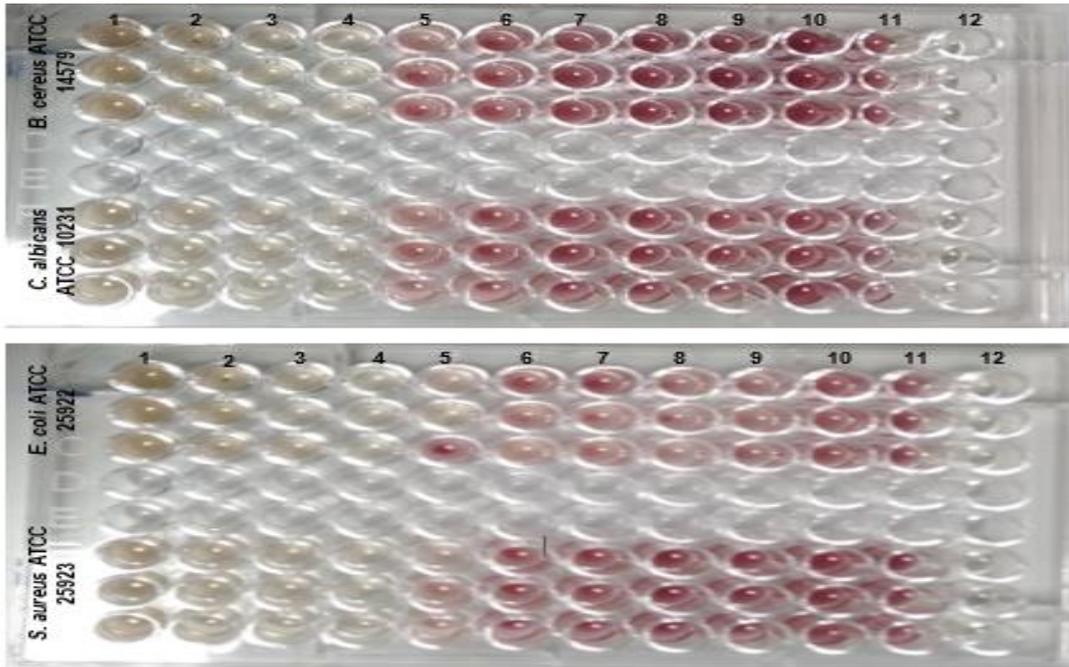


Figure 45 : Détermination de la CMI du rhamnolipide isolé BS-BSP9 *vis-à-vis* quatre souches pathogènes. Après 24 h d'incubation, 20 μ L de solution de colorant au chlorure de triphényltétrazolium (5 mg mL^{-1}) (TTC) ont été ajoutés à chaque puits. La colonne 12 confirme qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la préparation de la microplaque. La concentration la plus élevée incorporée dans la plaque était de 50 mg mL^{-1} (colonne 1) et la plus faible obtenue par double dilution en série était de 0,1 mg mL^{-1} (colonne 11).

Tableau 15 : Activité antimicrobienne, valeurs CMI et CMB du BS-BSP9 contre les souches pathogènes.

Souches pathogènes	Diamètres de zone d'inhibition (mm \pm SD)			CMI (mg mL^{-1}) ¹⁾	CMB (mg mL^{-1})
	Concentration de biosurfactant				
	50 (mg L^{-1})	25 (mg L^{-1})	12,5 (mg L^{-1})		
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	26,66 \pm 3,44	20 \pm 5,37	15,13 \pm 3,32	3,125	12,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	19,76 \pm 3,6	15,16 \pm 1,7	11,76 \pm 1,75	3,125	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26,16 \pm 6,48	18,53 \pm 0,56	16,36 \pm 2,22	3,125	6,25
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	28,63 \pm 6,7	21,83 \pm 5,05	14,43 \pm 2,11	3,125	25

CMI Concentration minimale inhibitrice ; CMB Concentration minimale bactéricide. L'expérience a été réalisée en triple pour garantir l'exactitude.

Dans des études récemment rapportées, deux BS synthétisés par deux *P. aeruginosa*, MR01 et MASH1, présentaient des diamètres de zone d'inhibition de 20 ± 2 mm et 15 ± 2 mm, respectivement, à une concentration de 30 mg mL^{-1} contre *S. aureus* ATCC 29213, avec des CMI de 0,128 et 0,512 mg mL^{-1} . Des CMI de 0,064 et 0,128 mg mL^{-1} ont été observées *vis-à-vis* de *B. cereus* PTCC 1247, les deux BSs produites par MR01 et MASH1 présentant des diamètres de zone d'inhibition de 30 ± 3 mm et 30 ± 2 mm à une concentration de 30 mg mL^{-1} , respectivement. Des CMI supérieures à $0,512 \text{ mg mL}^{-1}$ ont été observées contre *E. coli* ATCC 25922, sans aucune zone d'inhibition enregistré à aucune des concentrations testées [521]. Elshikh et al. ont noté des valeurs de CMI allant de 0,615 à 50 mg mL^{-1} contre diverses souches de *Staphylococcus* en utilisant des rhamnolipides produits par *Burkholderia thailandensis* E264. Ils ont noté une valeur CMB de $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ contre toutes les souches de *S. oralis* et *S. sanguis*, tandis que la valeur CMB dépassait 50 mg mL^{-1} lorsqu'il s'agissait de *S. mutans*. Dans la même étude, un rhamnolipide commercial, désigné JBR325, présentait des valeurs de CMI et de CMB de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ et $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivement, contre *S. mutans*, et de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ et $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, contre toutes les souches de *S. oralis* et *S. sanguis* [470]. Par ailleurs et dans une autre recherche, les valeurs de CMI utilisant un extrait brut de rhamnolipides variaient de $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ contre *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* et *Neisseria mucosa*, à $0,30 \text{ mg mL}^{-1}$ contre *Actinomyces naeslundii* [349].

Le rhamnolipide brut W10 a montré un effet antimicrobien sur *E. coli* ATCC 25922 à des concentrations allant jusqu'à $37,50 \text{ mg mL}^{-1}$, $9,37 \text{ mg mL}^{-1}$ contre *S. aureus* (SARM) ATCC 4330 et $2,34 \text{ mg mL}^{-1}$ contre *C. albicans*. ATCC10231 [350]. Les CMI du rhamnolipide produit à partir de *P. aeruginosa* ADMT1 étaient de $0,2$ et $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ contre les souches de *S. aureus* MRSA ATCC 43300 et MRSA ATCC 562, respectivement [507].

Il existe des données limitées sur la détection des CMB de BS contre des souches pathogènes. Il est intéressant de noter que les rhamnolipides présentent des propriétés antimicrobiennes qui profitent à *P. aeruginosa* en lui procurant un avantage naturel par rapport à d'autres micro-organismes lors de la colonisation d'une niche ou n'importe quel écosystème. Par ailleurs, les bio-tensioactifs produits par des souches marines des grands fonds appartenant aux genres *Pseudomonas*,

Halomonas, *Bacillus*, et *Streptomyces*, ont été trouvés très efficaces contre la levure pathogène *C. albicans* ATCC 10231 et *S. aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300 [525]. Dans le même sens, les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* BM02, isolée d'un sol de zone minière en Amazonie brésilienne, ont montré des propriétés antimicrobiennes marquées contre des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *E. faecium*), à une concentration de 50 µg mL⁻¹ [526]. Récemment, une étude a mis en évidence une activité antibactérienne remarquable d'un biosurfactant dirhamnolipide produit *P. mendocina* 7094 contre six pathogène humain entre Gram-positives et Gram-négatives. *B. cereus* 8733 s'est révélée principalement sensible (CMI de 32 µg mL⁻¹ et zone d'inhibition de 19 ± 0,1 mm) [527].

Sur la base d'études antérieures, le mécanisme d'action antimicrobien des BSs reste mal compris, même si certaines hypothèses suggèrent qu'ils perturbent l'intégrité de la membrane [522]. En ce qui concerne les rhamnolipides, il existe des preuves substantielles suggérant leur capacité à inhiber la croissance bactérienne pendant la phase exponentielle, suggérant qu'ils pourraient interférer avec la division cellulaire normale par la lyse de la membrane cellulaire [24].

Les deux BSs testés présentent de fortes propriétés antimicrobiennes, ce qui en fait des agents efficaces contre les agents pathogènes. Cela les rend précieux dans la lutte contre les bactéries devenues résistantes aux antibiotiques.

5.2. Remobilisation des hydrocarbures

La remobilisation des hydrocarbures est l'une des applications les plus remarquables des biosurfactants. Dans ce contexte, la capacité du rhamnolipide Rhl-BSP4 à éliminer le pétrole brut et l'huile moteur usée a été étudiée, comparativement à un surfactant synthétique (SDS). Comme le montre la Fig. 46, l'aptitude du rhamnolipide Rhl-BSP4 à récupérer le pétrole brut et l'huile de moteur usée était plus efficace par rapport à l'agent tensioactif synthétique (SDS). De même, les surnageants ont montré un effet de remobilisation élevé du pétrole brut et de l'huile de moteur usée, environ 4,4 fois et 4,8 fois respectivement, plus important que le SDS.

Ces observations sont cohérentes avec celles de Hentati et *al.* [9], qui ont noté que le rhamnolipide brut BS-NAPH6, synthétisé par *Pseudomonas* sp. souche NAPH6, ainsi que le surnageant de la culture NAPH6, pourraient récupérer une grande quantité d'huile moteur usée par rapport à différents tensioactifs synthétiques, notamment le SDS, le Tween 80 et le Tween 20. De plus, un rhamnolipide BSW10 sécrété par la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa* a montré une capacité de remobilisation élevée du pétrole brut par rapport au SDS. [142].

D'autres types de biosurfactants, comme le lipopeptide Bios-Cnaph3, synthétisé par la souche *Halomonas pacifica* Cnaph3 ont montré une capacité intéressante à éliminer les huiles moteur usées des sols pollués par rapport à plusieurs tensioactifs chimiques testés (Tween 80, SDS et Triton X-100) [25].

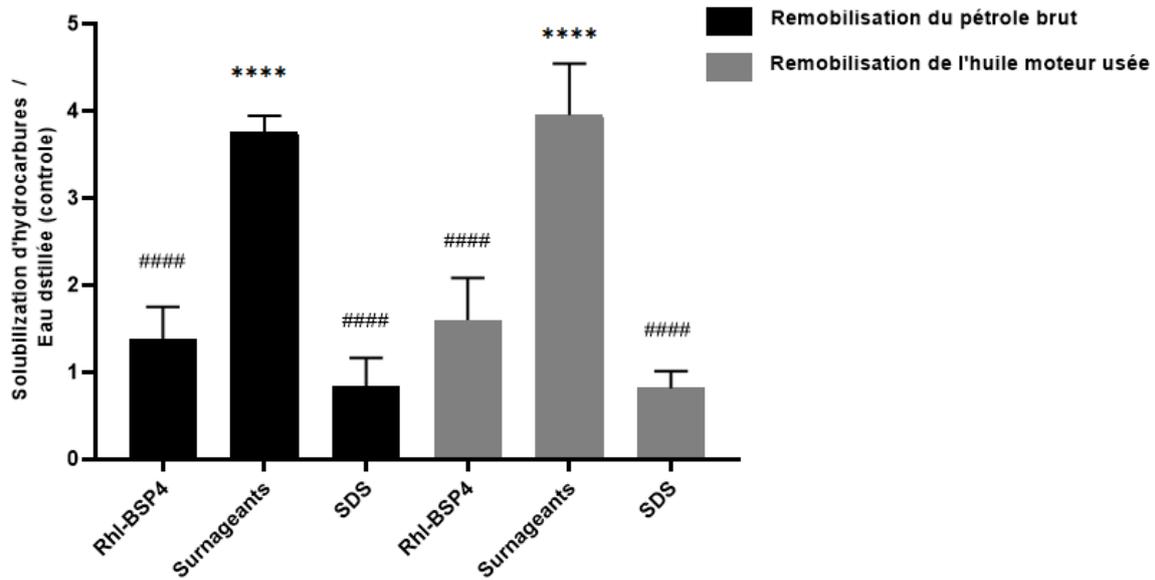


Figure 46 : Effets du rhamnolipide Rhl-BSP4, et de surnageants de la culture BSP4, sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols pollués par pétrole brut et l'huile moteur usée (20%, p/v) en comparaison avec un tensioactif chimique (SDS). Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois réplicats \pm écart type. L'astérisque indique $p < 0,05$ par rapport au traitement au Rhl-BSP4 brut. Le dièse indique $p < 0,05$ par rapport au traitement au surnageant acellulaire. (****, #### $< 0,0001$).

Par conséquent, le Rhl-BSP4 pourrait être recommandé comme biosurfactant efficace pour améliorer la récupération du pétrole, prolonger la durée de vie des réservoirs et nettoyer les déversements de pétrole grâce à la modification de la tension superficielle, de la mouillabilité et de la formation d'émulsions entre les particules de pétrole et d'eau [331]. Même aussi, L'application des surnageants dans la remobilisation des hydrocarbures, sans étapes d'extraction et de purification, pourrait être une approche prometteuse en raison de ses avantages économiques [9].

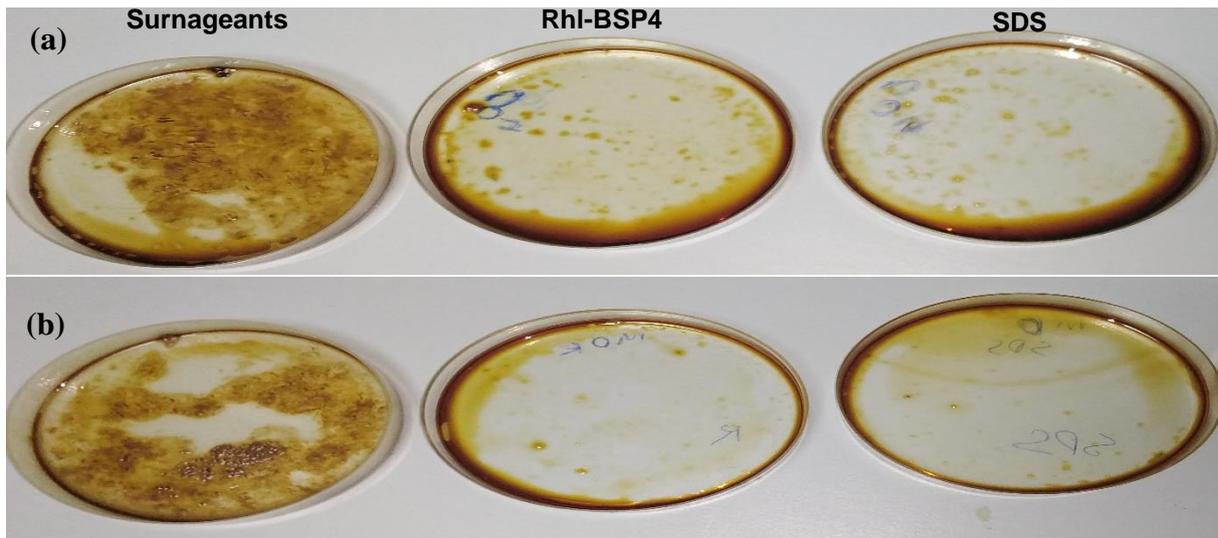


Figure 47 : Récupération du pétrole brut (a) et de l'huile moteur usée (b) des sols pollués *via* l'application de surnageants de la culture de BSP4, de Rhl-BSP4, ainsi que de surfactant chimique (SDS).

V. Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

La remédiation des hydrocarbures est désormais reconnue comme un enjeu mondial majeur, principalement en raison du rejet continu d'hydrocarbures persistants qui pose des difficultés tant pour les pays en développement que pour les pays industrialisés. Malgré de nombreux rapports sur les microorganismes dégradant les hydrocarbures, il est nécessaire de trouver de nouvelles souches avec des propriétés améliorées pour accroître l'efficacité de la bioremédiation.

Des bactéries indigènes ou autochtones trouvées dans des zones fortement contaminées, capables de métaboliser des hydrocarbures tout en libérant des BS, pourraient posséder ces caractéristiques souhaitables. Ces bactéries ont le potentiel d'être plus efficaces et mieux adaptées aux besoins environnementaux en augmentant la biodisponibilité des hydrocarbures persistants et en menant à leur dégradation.

Dans ce contexte, notre étude a été menée sur des échantillons des sols contaminés provenant de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Mascara, de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Chlef, et de la raffinerie pétrolière de Hassi Berkine, wilaya d'Ouargla. Les prélèvements ont été réalisés au cours de la période 2020-2021.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au début à l'isolement et le criblage des *Pseudomonas* ayant la capacité de produire de rhamnolipides. Par ailleurs, 38 souches ont été isolées, à partir de trois biotopes. La caractérisation phénotypique et phylogénétique a confirmé leurs appartenances aux *P. aeruginosa*.

La deuxième partie de cette thèse a porté sur le screening de bactéries capables de synthétiser des biosurfactants. La méthodologie principale s'articule sur la production et la caractérisation de ces biomolécules. Les tests de criblage ont été basé sur des test qualitatif et quantitatif, avec une attention particulière sur les tests quantitatifs et surtout la mesure de la tension de surface. Nous avons noté une haute performance pour les souches isolées des stations d'épurations des eaux usées en fonction de la réduction de la tension de surface de milieu et l'activité d'émulsification, meilleure réduction de la tension de surface a été inscrit par la souche BSP13 ($TS_{\text{finale}} = 32.68 \text{ mN m}^{-1}$), et meilleure activité d'émulsification a été vue chez la souche BSP8 avec un pourcentage de 71,25%. La majorité des souches

ont présenté des résultats positives pour les tests qualitatifs comme la méthode de CTAB agar, le test hémolytique, le test d'effondrement de goutte (drop collapsing), et le test de superposition d'hydrocarbure sur gélose.

Par conséquent, deux souches (BSP4 et BSP9) ont été sélectionnées pour la production des biosurfactants en utilisant différents substrats et la caractérisation des biosurfactants. Meilleure production de biosurfactants a été achevée par la souche BSP4 sur milieu BN additionné par huile de friture usée (1%, v/v) avec un rendement de $5.09 \pm 0.91 \text{ g L}^{-1}$ après 48 h d'incubation. D'autre part, un rendement significatif de $2.36 \pm 0.69 \text{ g L}^{-1}$ après 48 h d'incubation a été marqué par la souche BSP9 sur milieu de base additionné par 1% huile de friture usée, et $1.70 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ en présence de résidus d'huile de thon. Ces substrats sont des sources de carbone durables et renouvelables, minimisant ainsi le coût élevé de production de ces biosurfactants.

Nous nous sommes également focalisés dans la troisième partie de notre étude sur la caractérisation des biosurfactants produits. Pour cela, les extraits de biosurfactants produits par deux souches (BSP4 et BSP9) ont été analysés par FTIR et RMN du proton. Les résultats de ces analyses montrent que les biosurfactants produits par ces souches appartiennent à la famille des glucolipides, et notamment à la classe des rhamnolipides. La concentration micellaire critique des biosurfactants bruts produits par la souche BSP4 sur le milieu BN additionné avec l'huile d'olive et l'huile de friture usée (1%, v/v) est 350 mg L^{-1} et 20 mg L^{-1} pour le biosurfactant produit par BSP9 sur milieu LB. De plus, la stabilité environnementale des biosurfactants produits a été constatée *vis-à-vis* de la température (de -80 jusqu'à 121 °C), du pH (de 2 à 12), et de la salinité (de 2 à 12% pour Rhl-BSP4 ; de 2 à 10% pour BS-BSP9).

Au cours de cette étude, une autre investigation a été dédiée à étudier les potentialités bio-dégradatives des souches sélectionnées (BSP4 et BSP9). La souche BSP4 a été trouvée très tolérante au naphthalène (200 mg L^{-1}), avec une capacité de dégrader la totalité du naphthalène au bout de 7 jours d'incubation à 30 °C affirmée par les analyses GC-MS. Ces dernières prouvent qu'elle est capable de dégrader quasiment la totalité des hydrocarbures aliphatiques (de 4,8 à 83,91%) présents dans le pétrole brut (1%, v/v), au bout de 21 jours d'incubation à 30 °C.

Plus intéressant encore, la souche BSP9 montre une capacité remarquable de croître sur un panel des hydrocarbures à savoir les mono-aromatiques, les polycycliques, les alcanes, et le pétrole brut. Les analyses GC-FID montrent qu'elle est capable de dégrader la totalité du naphthalène (200 mg L^{-1}) au bout de 3 jours d'incubation (83,25%), 27,7%, et 68,33% de phénanthrène (200 mg L^{-1}), et fluoranthène (200 mg L^{-1}), respectivement, au bout de 7 jours d'incubation à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Les analyses GC-MS montrent qu'elle est capable de dégrader presque la majorité des hydrocarbures aliphatiques (86,28%) présents dans le pétrole brut (1%, v/v), au bout de 10 jours d'incubation à $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Les souches BSP4 et BSP9, ont montré des potentialités bio dégradatives intéressantes sur des hydrocarbures et en particulier sur des HAPs. Ceci, prouve que ces souches hydrocarbonoclastes pourraient être de bonnes candidates utilisées dans la biorestauration des environnements pollués par ces hydrocarbures persistants.

L'effet de rhamnolipide produit par la souche BSP4 sur la remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par le pétrole brut et l'huile de moteurs usée, en les comparant avec des surfactant chimique (SDS), a été effectué. Les résultats obtenus montrent un potentiel de remobilisation plus important vu par le bio tensioactif que le tensioactif synthétique.

Une autre part de cette étude visait à appliquer les biosurfactants Rhl-BSP4 et BS-BSP9 pour lutter contre les bactéries émergentes résistantes aux antibiotiques. Face à ce problème majeur de santé publique, leurs futurs usages constituent la pierre angulaire de la réduction de cette antibiorésistance. Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants testés ont des activités antimicrobiennes intéressantes contre une variété des microorganismes testés : bactérie à gram négatif (*E. coli* ATCC 25922 ; bactéries à gram positif (*B. cereus* ATCC 14579, *E. faecalis* ATCC 29212 et *S. aureus* ATCC 25923) ainsi que la levure *C. albicans* ATCC 10231.

Enfin, les résultats obtenus mettent en relief les propriétés tensioactives intéressantes des biosurfactants Rhl-BSP4, et BS-BSP9. Il nous semble pertinent d'encourager la possibilité de l'utilisation de ces produits biologiques dans diverses applications. Dans ce contexte et pour une valorisation biologique, des essais d'applications des biosurfactants étudiés ont été effectués : remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols, et activité antimicrobienne.

En termes de perspectives, d'autres études devraient se concentrer sur l'expansion de la capacité de production de biosurfactants afin de répondre à des usages plus variés. L'objectif est de trouver des conceptions de bioréacteurs adaptées pour la synthèse de biosurfactants à grande échelle. Cela inclut l'examen des sources de carbone les plus économiquement efficaces pour les rhamnolipides et l'amélioration des procédures de production afin de réduire les coûts et d'accroître la durabilité commerciale.

Une enquête plus approfondie devrait se centraliser sur l'intégration des méthodes de bioremédiation *in situ* produites avec d'autres, telles que la phytoremédiation et la nano bioremédiation, afin d'améliorer l'efficacité globale et d'élargir son champ d'application. De plus, mener des études sur l'adaptation des biosurfactants produits à une large gamme de situations environnementales contribuerait à garantir leur efficacité dans différentes applications industrielles.

Il est intéressant de noter qu'il est également recommandé que l'application d'un consortium en mélangeant et en adaptant diverses souches dégradant les hydrocarbures pourrait être très avantageuse pour une efficacité maximale de biodégradation et un retrait complet des hydrocarbures persistants. Une compréhension plus approfondie des mécanismes moléculaires régulant la synthèse de rhamnolipides pourrait être précieuse pour évaluer l'efficacité des processus de production grâce à l'utilisation de techniques bio-informatiques innovantes.

VI. Références

Bibliographique

Remarque : La partie de références bibliographiques été réalisée à l'aide du logiciel Mendeley®

Références bibliographiques

- [1] J. Hubeny, M. Harnisz, E. Korzeniewska, M. Buta, W. Zieliński, D. Rolbiecki, J. Giebułtowicz, G. Nałęcz-Jawecki, G. Płaza, Industrialization as a source of heavy metals and antibiotics which can enhance the antibiotic resistance in wastewater, sewage sludge and river water, *PLoS One* 16 (2021) e0252691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252691>.
- [2] A. Naha, S. Antony, S. Nath, D. Sharma, A. Mishra, D.T. Biju, A. Madhavan, P. Binod, S. Varjani, R. Sindhu, A hypothetical model of multi-layered cost-effective wastewater treatment plant integrating microbial fuel cell and nanofiltration technology: A comprehensive review on wastewater treatment and sustainable remediation, *Environmental Pollution* 323 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121274>.
- [3] M. Sarkar, Light-responsive biodegradation of wastewater pollutants: New developments and potential perspectives, *Journal of Hazardous Materials Advances* 10 (2023) 100281. <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2023.100281>.
- [4] S. Lamichhane, K.C. Bal Krishna, R. Sarukkalige, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review, *Chemosphere* 148 (2016) 336–353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.036>.
- [5] H.I. Abdel-shafy, M.S.M. Mansour, Phytoremediation for the Elimination of Metals, Pesticides, PAHs, and Other Pollutants from Wastewater and Soil, in: *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, 2018: pp. 101–136. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1>.
- [6] Z.L. Zhang, H.S. Hong, J.L. Zhou, G. Yu, Phase association of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Minjiang River Estuary, China, *Science of the Total Environment* 323 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.026>.
- [7] R. Roy, R. Ray, R. Chowdhury, P. Bhattacharya, Degradation of polyaromatic hydrocarbons by mixed culture isolated from oil contaminated soil - A bioprocess engineering study, *Indian J Biotechnol* 6 (2007).
- [8] S. Bhatia, M. Kalia, B. Singh, Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons: Current status and recent advances, in: *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_15.
- [9] D. Hentati, A. Chebbi, A. Mahmoudi, F. Hadrich, M. Cheffi, I. Frikha, S. Sayadi, M. Chamkha, Biodegradation of hydrocarbons and biosurfactants production by a newly halotolerant *Pseudomonas* sp. strain isolated from contaminated seawater, *Biochem Eng J* 166 (2021) 107861. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107861>.
- [10] T. Zang, H. Wu, B. Yan, Y. Zhang, C. Wei, Enhancement of PAHs biodegradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs, *Chemosphere* 266 (2021) 128941. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128941>.

- [11] U. Conejo-Saucedo, D.R. Olicón-Hernández, T. Robledo-Mahón, H.P. Stein, C. Calvo, E. Aranda, Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Contaminated Soil Through Fungal Communities, in: 2019: pp. 217–236. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25506-0_8.
- [12] A. Alemzadeh, Phytobiont and Ecosystem Restitution, in: Phytobiont and Ecosystem Restitution, 2018: pp. 23–44. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1>.
- [13] H.R. Dash, S. Das, Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes, *Int Biodeterior Biodegradation* 75 (2012) 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>.
- [14] A. Chaida, A. Chebbi, F. Bensalah, A. Franzetti, Isolation and characterization of a novel rhamnolipid producer *Pseudomonas* sp. LGMS7 from a highly contaminated site in Ain El Arbaa region of Ain Temouchent, Algeria, *3 Biotech* 11 (2021) 200. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02751-6>.
- [15] M. Cheffi, D. Hentati, A. Chebbi, N. Mhiri, S. Sayadi, A.M. Marqués, M. Chamkha, Isolation and characterization of a newly naphthalene-degrading *Halomonas pacifica*, strain Cnaph3: biodegradation and biosurfactant production studies, *3 Biotech* 10 (2020) 89. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2085-x>.
- [16] M.L. Ibrahim, U.J.J. Ijah, S.B. Manga, L.S. Bilbis, S. Umar, Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria, *Int Biodeterior Biodegradation* 81 (2013) 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.012>.
- [17] R. Singh, B.R. Glick, D. Rathore, Biosurfactants as a Biological Tool to Increase Micronutrient Availability in Soil: A Review, *Pedosphere* 28 (2018) 170–189. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60018-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60018-9).
- [18] Q. Xu, M. Nakajima, Z. Liu, T. Shiina, Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application, *Int J Mol Sci* 12 (2011) 462–475. <https://doi.org/10.3390/ijms12010462>.
- [19] H.W.C. Araújo, R.F.S. Andrade, D. Montero-Rodríguez, D. Rubio-Ribeaux, C.A. Alves Da Silva, G.M. Campos-Takaki, Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications, *Microb Cell Fact* 18 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>.
- [20] S. Lal, S. Ratna, O. Ben Said, R. Kumar, Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology, *Environ Technol Innov* 10 (2018) 243–263. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.011>.
- [21] K. Paraszkiwicz, M. Moryl, G. Płaza, D. Bhagat, S. K. Satpute, P. Bernat, Surfactants of microbial origin as antibiofilm agents, *Int J Environ Health Res* 31 (2021) 401–420. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1664729>.

- [22] D. Sharma, B.S. Saharan, S. Kapil, Applications of Biosurfactants, in: Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 73–82. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26215-4_6.
- [23] R. Marchant, I.M. Banat, Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants?, *Biotechnol Lett* 34 (2012) 1597–1605. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x>.
- [24] P.J. Naughton, R. Marchant, V. Naughton, I.M. Banat, Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries, *J Appl Microbiol* 127 (2019) 12–28. <https://doi.org/10.1111/jam.14243>.
- [25] M. Cheffi, A. Maalej, A. Mahmoudi, D. Hentati, A.M. Marques, S. Sayadi, M. Chamkha, Lipopeptides production by a newly *Halomonas venusta* strain: Characterization and biotechnological properties, *Bioorg Chem* 109 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104724>.
- [26] N. Dombrowski, J.A. Donaho, T. Gutierrez, K.W. Seitz, A.P. Teske, B.J. Baker, Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill, *Nat Microbiol* 1 (2016). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.57>.
- [27] S.K. Satpute, G.R. Kulkarni, A.G. Banpurkar, I.M. Banat, N.S. Mone, R.H. Patil, S.S. Cameotra, Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications, *J Basic Microbiol* 56 (2016) 1140–1158. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600143>.
- [28] A. Chebbi, D. Hentati, M. Cheffi, R. Bouabdallah, C. Choura, S. Sayadi, M. Chamkha, Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 93 (2018). <https://doi.org/10.1002/jctb.5508>.
- [29] X. Xu, S. Nie, H. Ding, F.F. Hou, Environmental pollution and kidney diseases, *Nat Rev Nephrol* 14 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrneph.2018.11>.
- [30] H.J. Tsai, P.Y. Wu, J.C. Huang, S.C. Chen, Environmental pollution and chronic kidney disease, *Int J Med Sci* 18 (2021). <https://doi.org/10.7150/ijms.51594>.
- [31] J.C. Bertrand, P. Doumenq, R. Guyoneaud, B. Marrot, F. Fabrice Martin-Laurent, R. Matheron, P. Moulin, G. Soulas, Applied Microbial Ecology and Bioremediation: Microorganisms as major actors of pollution elimination in the environment, in: *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*, 2015. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2_16.
- [32] S. Berkat, A. Meliani, H.E. Mazari, S. Aliane, Microbial biosurfactants: prospects of sustainable molecules with promising applications in bioremediation, *Environmental and Experimental Biology* 20 (2022) 155–164. <https://doi.org/10.22364/eeb.20.14>.

- [33] A.P. Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, J. Tammineedi, L. Kanumuri, B.K. Ravuru, V. ramu Dirisala, V.P. Kodali, Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review, *Petroleum* 4 (2018) 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>.
- [34] V. de Lorenzo, Biodegradation and Bioremediation: An Introduction, in: *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation*, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50433-9_1.
- [35] S.R. Tirkey, S. Ram, S. Mishra, Naphthalene degradation studies using *Pseudomonas* sp. strain SA3 from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, *Heliyon* 7 (2021) e06334. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06334>.
- [36] I.A. Phulpoto, Z. Yu, J. Li, F. Ndayisenga, B. Hu, M.A. Qazi, X. Yang, Evaluation of di-rhamnolipid biosurfactants production by a novel *Pseudomonas* sp. S1WB: Optimization, characterization and effect on petroleum-hydrocarbon degradation, *Ecotoxicol Environ Saf* 242 (2022) 113892. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113892>.
- [37] S. Ratna, R. Kumar, Production of di-rhamnolipid with simultaneous distillery wastewater degradation and detoxification by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* SRRBL1, *J Clean Prod* 336 (2022) 130429. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130429>.
- [38] S. Das, H.R. Dash, Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas, in: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7>.
- [39] J.O. Nriagu, Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere [7], *Nature* 279 (1979). <https://doi.org/10.1038/279409a0>.
- [40] S. Gupta, R. Dobhal, A. Gupta, U. Rani, V. Kumar, Water quality assessment and treatment of pharmaceutical industry wastewater: A case study of pharmacy Selaqui, Dehradun of Uttarakhand State, India, in: *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_18.
- [41] . J.K., SEASONAL VARIATIONS IN WATER QUALITY INDEX OF SIRHIND CANAL PASSING THROUGH MOGA, PUNJAB, INDIA, *Int J Res Eng Technol* 03 (2014). <https://doi.org/10.15623/ijret.2014.0305103>.
- [42] I. Manisalidis, E. Stavropoulou, A. Stavropoulos, E. Bezirtzoglou, Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review, *Front Public Health* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00014>.
- [43] WHO, WHO | Air pollution, World Health Organization (2019).
- [44] W. Roberts, Air pollution and skin disorders, *Int J Womens Dermatol* 7 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.11.001>.

- [45] G. Hoek, R.M. Krishnan, R. Beelen, A. Peters, B. Ostro, B. Brunekreef, J.D. Kaufman, Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: A review, *Environ Health* 12 (2013). <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-43>.
- [46] J. Carré, N. Gatimel, J. Moreau, J. Parinaud, R. Léandri, Does air pollution play a role in infertility?: A systematic review, *Environ Health* 16 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0291-8>.
- [47] J. Krutmann, Air pollution and the skin, *Hautarzt* 70 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00105-018-4349-5>.
- [48] S.E. Mancebo, S.Q. Wang, Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 29 (2015). <https://doi.org/10.1111/jdv.13250>.
- [49] N.K. Sahoo, A. Ramesh, K. Pakshirajan, Bacterial degradation of aromatic xenobiotic compounds: An overview on metabolic pathways and molecular approaches, in: *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_10.
- [50] X. Zhang, X. Gai, Z. Zhong, F. Bian, C. Yang, Y. Li, X. Wen, Understanding variations in soil properties and microbial communities in bamboo plantation soils along a chromium pollution gradient, *Ecotoxicol Environ Saf* 222 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112507>.
- [51] M. Liu, X. Han, J. Tong, H. Zhu, X. Bai, Mutual environmental drivers of the community composition, functional attributes and co-occurrence patterns of bacterioplankton in the composite aquatic ecosystem of Taihu watershed in China, *FEMS Microbiol Ecol* 96 (2020). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa137>.
- [52] X. Li, D. Meng, J. Li, H. Yin, H. Liu, X. Liu, C. Cheng, Y. Xiao, Z. Liu, M. Yan, Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination, *Environmental Pollution* 231 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>.
- [53] X. Wang, Y. Teng, X. Wang, Y. Xu, R. Li, Y. Sun, W. Hu, L. Zhao, W. Ren, Y. Luo, Effects of combined pollution of organic pollutants and heavy metals on biodiversity and soil multifunctionality in e-waste contaminated soil, *J Hazard Mater* 440 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129727>.
- [54] J.K. Bwapwa, A.T. Jaiyeola, *Emerging Contaminants in Drinking Water and Wastewater, Effects on Environment and Remediation*, 2019.
- [55] S. Siddique, Major Pollutants of Contaminated Paddy Soils, in: 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93671-0_1.

- [56] R. Stone, Confronting a toxic blowback from the electronics trade, *Science* (1979) 325 (2009). https://doi.org/10.1126/science.325_1055.
- [57] E.O. Atakpa, H. Zhou, L. Jiang, Y. Ma, Y. Liang, Y. Li, D. Zhang, C. Zhang, Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria, *Chemosphere* 290 (2022) 133337. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133337>.
- [58] M.S. Safdari, H.R. Kariminia, Z. Ghobadi Nejad, T.H. Fletcher, Study Potential of Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water, *Water Air Soil Pollut* 228 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3220-5>.
- [59] S. Varjani, V.N. Upasani, A. Pandey, Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination, *Science of the Total Environment* 737 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139766>.
- [60] K. Ramadass, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu, Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation, *Science of the Total Environment* 636 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.379>.
- [61] B. Bhuyan, P. Pandey, Remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using hydrocarbonoclastic rhizobacteria, applied through *Azadirachta indica* rhizosphere, *Int J Phytoremediation* 24 (2022). <https://doi.org/10.1080/15226514.2022.2033689>.
- [62] I.C. Ossai, A. Ahmed, A. Hassan, F.S. Hamid, Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review, *Environ Technol Innov* 17 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>.
- [63] R. Patowary, K. Patowary, M.C. Kalita, S. Deka, Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil, *Int Biodeterior Biodegradation* 129 (2018) 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.004>.
- [64] D. Kučić Grgić, V. Ocelić Bulatović, M. Cvetnić, Ž. Dujmić Vučinić, M. Vuković Domanovac, M. Markić, T. Bolanča, Biodegradation kinetics of diuron by *Pseudomonas aeruginosa* FN and optimization of biodegradation using response surface methodology, *Water and Environment Journal* 34 (2020). <https://doi.org/10.1111/wej.12505>.
- [65] A. Naha, D.C. Nath, S. Nath, Impact of pesticides on the growth of *Coriandrum sativum*, *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 12 (2020). <https://doi.org/10.5897/IJPPB2020.0301>.
- [66] P. Rajput, A. Thakur, P. Devi, Emerging agrochemicals contaminants: current status, challenges, and technological solutions, in: *Agrochemicals Detection, Treatment and*

- Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00005-2>.
- [67] S. Dwivedi, B.R. Singh, A.A. Al-Khedhairy, J. Musarrat, Biodegradation of isoproturon using a novel *Pseudomonas aeruginosa* strain JS-11 as a multi-functional bioinoculant of environmental significance, *J Hazard Mater* 185 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.110>.
- [68] M. Shabbir, M. Singh, S. Maiti, S. Kumar, S.K. Saha, Removal enactment of organo-phosphorous pesticide using bacteria isolated from domestic sewage, *Bioresour Technol* 263 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.122>.
- [69] R. Narayan, U.Y. Nayak, A.M. Raichur, S. Garg, Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances, *Pharmaceutics* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118>.
- [70] L.G.C. Villegas, N. Mashhadi, M. Chen, D. Mukherjee, K.E. Taylor, N. Biswas, A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater, *Curr Pollut Rep* 2 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0035-3>.
- [71] D. Bhatia, N.R. Sharma, J. Singh, R.S. Kanwar, Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review, *Crit Rev Environ Sci Technol* 47 (2017). <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1393263>.
- [72] K. Sarayu, S. Sandhya, Current technologies for biological treatment of textile wastewater-A review, *Appl Biochem Biotechnol* 167 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9716-6>.
- [73] S.S. Mohanty, A. Kumar, Enhanced degradation of anthraquinone dyes by microbial monoculture and developed consortium through the production of specific enzymes, *Sci Rep* 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87227-6>.
- [74] A. Pandey, P. Singh, L. Iyengar, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes, *Int Biodeterior Biodegradation* 59 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.006>.
- [75] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects, *ACS Catal* 9 (2019). <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171>.
- [76] S.S. Ali, T. Elsamahy, R. Al-Tohamy, D. Zhu, Y.A.G. Mahmoud, E. Koutra, M.A. Metwally, M. Kornaros, J. Sun, Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects, *Science of the Total Environment* 780 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>.
- [77] S.S. Ali, T. Elsamahy, E. Koutra, M. Kornaros, M. El-Sheekh, E.A. Abdelkarim, D. Zhu, J. Sun, Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current

- status of knowledge and future perspectives of disposal, *Science of the Total Environment* 771 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>.
- [78] H.K. Webb, J. Arnott, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate), *Polymers (Basel)* 5 (2013). <https://doi.org/10.3390/polym5010001>.
- [79] L. Hou, D. Kumar, C.G. Yoo, I. Gitsov, E.L.W. Majumder, Conversion and removal strategies for microplastics in wastewater treatment plants and landfills, *Chemical Engineering Journal* 406 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126715>.
- [80] E. Lahive, A. Walton, A.A. Horton, D.J. Spurgeon, C. Svendsen, Microplastic particles reduce reproduction in the terrestrial worm *Enchytraeus crypticus* in a soil exposure, *Environmental Pollution* 255 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113174>.
- [81] E. Huerta Lwanga, J. Mendoza Vega, V. Ku Quej, J. de los A. Chi, L. Sanchez del Cid, C. Chi, G. Escalona Segura, H. Gertsen, T. Salánki, M. van der Ploeg, A.A. Koelmans, V. Geissen, Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14588-2>.
- [82] V.M. Pathak, Navneet, Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach, *Bioresour Bioprocess* 4 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>.
- [83] D. Mukhopadhyay, N. Khan, N. Kamal, S. Varjani, S. Singh, R. Sindhu, P. Gupta, P.C. Bhargava, Degradation of β -lactam antibiotic ampicillin using sustainable microbial peroxide producing cell system, *Bioresour Technol* 361 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127605>.
- [84] M.A. Al-Nuaim, A.A. Alwasiti, Z.Y. Shnain, The photocatalytic process in the treatment of polluted water, *Chemical Papers* 77 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02468-7>.
- [85] F. Hu, P. Wang, Y. Li, J. Ling, Y. Ruan, J. Yu, L. Zhang, Bioremediation of environmental organic pollutants by *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms, methods and challenges, *Environ Res* 239 (2023) 117211. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.117211>.
- [86] O. Parthiba Karthikeyan, E. Trably, S. Mehariya, N. Bernet, J.W.C. Wong, H. Carrere, Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review, *Bioresour Technol* 249 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.105>.
- [87] J. Shi, Y. Chen, X. Liu, D. Li, Rhamnolipid production from waste cooking oil using newly isolated halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* M4, *J Clean Prod* 278 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123879>.
- [88] K. Zhu, L. Zhang, L. Mu, J. Ma, C. Li, A. Li, Comprehensive investigation of soybean oil-derived LCFAs on anaerobic digestion of organic waste: Inhibitory effect and transformation, *Biochem Eng J* 151 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107314>.

- [89] P. Borah, M. Kumar, P. Devi, Types of inorganic pollutants: metals/metalloids, acids, and organic forms, in: *Inorganic Pollutants in Water*, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818965-8.00002-0>.
- [90] A.O. Oyeyiola, K.O. Olayinka, B.I. Alo, Comparison of three sequential extraction protocols for the fractionation of potentially toxic metals in coastal sediments, *Environ Monit Assess* 172 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1336-4>.
- [91] M.V. Reddy, D. Satpathy, K.S. Dhiviya, Assessment of heavy metals (Cd and Pb) and micronutrients (Cu, Mn, and Zn) of paddy (*Oryza sativa* L.) field surface soil and water in a predominantly paddy-cultivated area at Puducherry (Pondicherry, India), and effects of the agricultural runoff on the elemental concentrations of a receiving rivulet, *Environ Monit Assess* 185 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10661-012-3057-3>.
- [92] Committee On Toxicology, *Arsenic in Drinking Water 2001 Update*, 2001.
- [93] S. Mishra, Z. Lin, S. Pang, Y. Zhang, P. Bhatt, S. Chen, Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils, *J Hazard Mater* 418 (2021) 126253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>.
- [94] M. Das, A. Adholeya, Role of microorganisms in remediation of contaminated soil, in: *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_4.
- [95] J. Lacal, The Potential of Hydrocarbon Chemotaxis to Increase Bioavailability and Biodegradation Efficiency, in: *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8_3.
- [96] H. Harms, K.E.C. Smith, L.Y. Wick, Problems of Hydrophobicity/Bioavailability: An Introduction, in: *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8_38.
- [97] H. Wilkes, J. Schwarzbauer, Hydrocarbons: An Introduction to Structure, Physico-Chemical Properties and Natural Occurrence, in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_1.
- [98] B.P. Tissot, D.H. Welte, *Petroleum Formation and Occurrence, A New Approach to Oil and Gas Exploration*, Second Edition, 1984.
- [99] S. Murov, *Organic Chemistry: Structure and Function*, 2007.
- [100] S. Hazrati, R. Rostami, M. Farjaminezhad, M. Fazlzadeh, Preliminary assessment of BTEX concentrations in indoor air of residential buildings and atmospheric ambient air in Ardabil, Iran, *Atmos Environ* 132 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.02.042>.
- [101] S.L. Paralovo, G.C. Borillo, C.G.G. Barbosa, A.F.L. Godoi, C.I. Yamamoto, R.A.F. de Souza, R. V. Andreoli, P.S. Costa, G.P. Almeida, A.O. Manzi, C. Pöhlker, A.M. Yáñez-Serrano, J.

- Kesselmeier, R.H.M. Godoi, Observations of atmospheric monoaromatic hydrocarbons at urban, semi-urban and forest environments in the Amazon region, *Atmos Environ* 128 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.12.053>.
- [102] W. Ma, J. Hu, J. Li, J. Li, P. Wang, C.P. Okoli, Distribution, source, and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the soils from a typical petroleum refinery area in south China, *Environ Monit Assess* 194 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10281-8>.
- [103] S. Ma, C. Yue, J. Tang, M. Lin, M. Zhuo, Y. Yang, G. Li, T. An, Occurrence and distribution of typical semi-volatile organic chemicals (SVOCs) in paired indoor and outdoor atmospheric fine particle samples from cities in southern China, *Environmental Pollution* 269 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116123>.
- [104] T. Hu, J. Zhang, X. Xing, C. Zhan, L. Zhang, H. Liu, T. Liu, J. Zheng, R. Yao, J. Cao, Seasonal variation and health risk assessment of atmospheric PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in a classic agglomeration industrial city, central China, *Air Qual Atmos Health* 11 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11869-018-0575-3>.
- [105] S. Singh, A. Ashesh, N. Linthoingambi Devi, I.C. Yadav, A comprehensive review on occurrence, source, effect, and measurement techniques of polycyclic aromatic hydrocarbons in India, *Microchemical Journal* 183 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108005>.
- [106] J. Higginson, V.T. DeVita, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans., *Am Ind Hyg Assoc J* 41 (1980). <https://doi.org/10.1136/oem.42.3.214>.
- [107] A. Anttila, R. V. Bhat, J.A. Bond, S.J. Borghoff, F.X. Bosch, G.P. Carlson, M. Castegnaro, G. Cruzan, W.C.A. Gelderblom, U. Hass, S.H. Henry, R.A. Herbert, M. Jackson, T. Jiang, A.D. Kinghorn, S. Knasmüller, L. Levy, D. McGregor, J.D. Miller, H. Mori, S.S. Olin, D.L. Park, J.I. Pitt, R.T. Riley, H.H. Schmeiser, J. Siemiatycki, J.L. Vanherweghem, C.P. Wild, T. Yoshizawa, A.R. Buckpitt, P.M. Coates, G.L. Foureman, T. Green, C.W. Jameson, D. Longfellow, R. Baan, M. Bird, J. Cheney, S. Franceschi, M. Friesen, Y. Grosse, T. Junghans, N. Napalkov, C. Partensky, J. Rice, V. Sewram, L. Stayner, K. Straif, E. Suonio, S. Egraz, B. Kajo, M. Lézère, J. Mitchell, E. Perez, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 82 (2002). [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00216-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00216-2).
- [108] International Agency for Research on Cancer (IARC), Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts - IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100C, 2012.
- [109] EPA, EPA Method 8100:PAH analysis, EPA (1986).

- [110] I.C.T. Nisbet, P.K. LaGoy, Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 16 (1992). [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X).
- [111] A. Thacharodi, S. Hassan, T. Singh, R. Mandal, J. Chinnadurai, H.A. Khan, M.A. Hussain, K. Brindhadevi, A. Pugazhendhi, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: An updated microbiological review, *Chemosphere* 328 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138498>.
- [112] R. Pissinatti, S.V.C. de Souza, HC-0A-02: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from food, in: *Environmental Footprints and Eco-Design of Products and Processes*, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4_2.
- [113] A. Bright, F. Li, M. Movahed, H. Shi, B. Xue, Chronic Exposure to Low-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Promotes Lipid Accumulation and Metabolic Inflammation, *Biomolecules* 13 (2023). <https://doi.org/10.3390/biom13020196>.
- [114] Sakshi, A.K. Haritash, A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation, *Arch Microbiol* 202 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01929-5>.
- [115] Z. Wang, P. Ren, Y. Sun, X. Ma, X. Liu, G. Na, Z. Yao, Gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal atmosphere of the north Yellow Sea, China, *Environmental Science and Pollution Research* 20 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1588-y>.
- [116] A. Masih, A. Taneja, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentrations and related carcinogenic potencies in soil at a semi-arid region of India, *Chemosphere* 65 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.062>.
- [117] A. Cachada, P. Pato, T. Rocha-Santos, E.F. da Silva, A.C. Duarte, Levels, sources and potential human health risks of organic pollutants in urban soils, *Science of the Total Environment* 430 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.075>.
- [118] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [119] S.K. Shukla, N. Mangwani, T.S. Rao, S. Das, Biofilm-Mediated Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00008-X>.
- [120] Y. Guo, K. Wu, X. Huo, X. Xu, Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J Environ Health* 73 (2011).
- [121] D.L. Diggs, A.C. Huderson, K.L. Harris, J.N. Myers, L.D. Banks, P. V. Rekhadevi, M.S. Niaz, A. Ramesh, Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: A

- perspective, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 29 (2011). <https://doi.org/10.1080/10590501.2011.629974>.
- [122] A.C. Olsson, J. Fevotte, T. Fletcher, A. Cassidy, A. 'T Mannetje, D. Zaridze, N. Szeszenia-Dabrowska, P. Rudnai, J. Lissowska, E. Fabianova, D. Mates, V. Bencko, L. Foretova, V. Janout, P. Brennan, P. Boffetta, Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: A multicenter study in Europe, *Occup Environ Med* 67 (2010). <https://doi.org/10.1136/oem.2009.046680>.
- [123] K.P. Singh, A. Malik, R. Kumar, P. Saxena, S. Sinha, Receptor modeling for source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban atmosphere, in: *Environ Monit Assess*, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9674-6>.
- [124] S.K. Samanta, O. V. Singh, R.K. Jain, Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation, *Trends Biotechnol* 20 (2002) 243–248. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01943-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01943-1).
- [125] N. Das, D. Das, Strategies for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil - An overview, *Journal of Critical Reviews* 2 (2015).
- [126] E.C. Uche, A. Dadrasnia, HC-0B-06: Biodegradation of hydrocarbons, in: *Environmental Footprints and Eco-Design of Products and Processes*, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0201-4_3.
- [127] R.E. Parales, J.L. Ditty, Chemotaxis to Hydrocarbons, in: *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50542-8_43.
- [128] T. Sayara, A. Sánchez, Bioremediation of PAH-contaminated soils: Process enhancement through composting/compost, *Applied Sciences (Switzerland)* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/app10113684>.
- [129] H. Deka, J. Lahkar, Soil Bacteria for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Remediation: Application Potentialities and Limitations, in: K.R. Hakeem, M.S. Akhtar, S.N.A. Abdullah (Eds.), *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 291–316. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_15.
- [130] D.T. Gibson, V. Mahadevan, D.M. Jerina, H. Yagi, H.J.C. Yeh, Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium, *Science* (1979) 189 (1975). <https://doi.org/10.1126/science.1145203>.
- [131] M.A. Baboshin, L.A. Golovleva, Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects, *Microbiology (Russian Federation)* 81 (2012). <https://doi.org/10.1134/S0026261712060021>.

- [132] R.A. Kanaly, S. Harayama, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *J Bacteriol* 182 (2000). <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000>.
- [133] W. Fritsche, M. Hofrichter, Aerobic Degradation by Microorganisms, in: *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, 2008. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch6m>.
- [134] A.K. Haritash, C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review., *J Hazard Mater* 169 (2009) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- [135] M. Sun, Y. Luo, P. Christie, Z. Jia, Z. Li, Y. Teng, Methyl- β -cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and associated microbial activity in contaminated soil, *Journal of Environmental Sciences* 24 (2012). [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60865-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60865-6).
- [136] S.Y. Yuan, B. V. Chang, Anaerobic degradation of five polycyclic aromatic hydrocarbons from river sediment in Taiwan, *J Environ Sci Health B* 42 (2007). <https://doi.org/10.1080/03601230601020860>.
- [137] M.M. Rothermich, L.A. Hayes, D.R. Lovley, Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment, *Environ Sci Technol* 36 (2002). <https://doi.org/10.1021/es0200241>.
- [138] F.D. Bergmann, D. Selesi, R.U. Meckenstock, Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate-reducing enrichment culture N47, *Arch Microbiol* 193 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0667-4>.
- [139] R. Ambrosoli, L. Petruzzelli, J.L. Minati, F.A. Marsan, Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions, *Chemosphere* 60 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.030>.
- [140] R. Margesin, F. Schinner, Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments, *Appl Microbiol Biotechnol* 56 (2001). <https://doi.org/10.1007/s002530100701>.
- [141] A. Hidayat, S. Tachibana, Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 under stress with artificial sea water, *Journal of Environmental Science and Technology* 5 (2012). <https://doi.org/10.3923/jest.2012.64.73>.
- [142] A. Chebbi, D. Hentati, H. Zaghden, N. Baccar, F. Rezgui, M. Chalbi, S. Sayadi, M. Chamkha, Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil, *Int Biodeterior Biodegradation* 122 (2017) 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.006>.

- [143] S. Kazemzadeh, Z. Emami-Karvani, N.S. Naghavi, G. Emtiazi, Production of surface-active sophorolipid biosurfactant and crude oil degradability by novel *Rhodotorula mucilaginosa* strain SKF2, *J Surfactants Deterg* 25 (2022). <https://doi.org/10.1002/jsde.12572>.
- [144] M.Y. Fan, R.J. Xie, G. Qin, Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast, *Environmental Technology (United Kingdom)* 35 (2014). <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.829504>.
- [145] M.S.A. Abdel-megeed, Psychrophilic degradation of long chain alkanes, University of Hamburg-Harburg (2004).
- [146] E.Z. Ron, E. Rosenberg, Biosurfactants and oil bioremediation, *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00316-6).
- [147] O.O. Alegbeleye, B.O. Opeolu, V.A. Jackson, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation, *Environ Manage* 60 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>.
- [148] M. Ali, X. Song, D. Ding, Q. Wang, Z. Zhang, Z. Tang, Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: Challenges and enhancement strategies, *Environmental Pollution* 295 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118686>.
- [149] N. Kungwani, S.K. Shukla, T. Subba Rao, S. Das, Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current status and future perspectives, in: *Microbial Biodegradation and Bioremediation: Techniques and Case Studies for Environmental Pollution*, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00021-7>.
- [150] E. Pandolfo, A. Barra Caracciolo, L. Rolando, Recent Advances in Bacterial Degradation of Hydrocarbons, *Water (Switzerland)* 15 (2023). <https://doi.org/10.3390/w15020375>.
- [151] U.C. Ugochukwu, F. Okonkwo, W. Sokari, C. Eneh, L. Ezogu, Bioremediation Strategy Based on Risk Assessment of Exposure to Residual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *J Environ Manage* 280 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111650>.
- [152] A. Imam, S. Kumar Suman, P.K. Kanaujia, A. Ray, Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review, *Bioresour Technol* 343 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126121>.
- [153] L. Kumar, M. Chugh, S. Kumar, K. Kumar, J. Sharma, N. Bharadvaja, Remediation of petrorefinery wastewater contaminants: A review on physicochemical and bioremediation strategies, *Process Safety and Environmental Protection* 159 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.01.009>.
- [154] F.F. de Almeida, D. Freitas, F. Motteran, B.S. Fernandes, S. Gavazza, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated mangroves: Understanding the historical

- and key parameter profiles, *Mar Pollut Bull* 169 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112553>.
- [155] J.K. Bwapwa, Factors affecting the bioremediation of industrial and domestic wastewaters, in: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2022. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85455-9.00030-8>.
- [156] R.M. Pawar, The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS), *J Bioremediat Biograd* 06 (2015). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000291>.
- [157] N.A. Ismail, N. Kasmuri, N. Hamzah, Microbial Bioremediation Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs)—a Review, *Water Air Soil Pollut* 233 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05598-6>.
- [158] H.P. Bacosa, S.M.B. Ancla, C.G.L.A. Arcadio, J.R.A. Dalogdog, D.M.C. Ellos, H.D.A. Hayag, J.G.P. Jarabe, A.J.T. Karim, C.K.P. Navarro, M.P.I. Palma, R.A. Romarate, K.M. Similatan, J.A.B. Tangkion, S.N.A. Yurong, J.A. Mabuhay-Omar, C. Inoue, P.L. Adhikari, From Surface Water to the Deep Sea: A Review on Factors Affecting the Biodegradation of Spilled Oil in Marine Environment, *J Mar Sci Eng* 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/jmse10030426>.
- [159] L. Molina, A. Segura, Biochemical and metabolic plant responses toward polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals present in atmospheric pollution, *Plants* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10112305>.
- [160] G. Kebede, T. Tafese, E.M. Abda, M. Kamaraj, F. Assefa, Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts, *J Chem* 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>.
- [161] M.A. Al-Dossary, S.A. Abood, H.T. Al-Saad, Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*, *Remediation* 30 (2020). <https://doi.org/10.1002/rem.21658>.
- [162] A.B. Patel, K.R. Jain, T. Manvar, C. Desai, D. Madamwar, Enriched bacterial community efficiently degrade polycyclic aromatic hydrocarbons in soil ecosystem: Insights from a mesocosms study, *Biochem Eng J* 185 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108516>.
- [163] Y. Li, W. Li, L. Ji, F. Song, T. Li, X. Fu, Q. Li, Y. Xing, Q. Zhang, J. Wang, Effects of Salinity on the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oilfield Soils Emphasizing Degradation Genes and Soil Enzymes, *Front Microbiol* 12 (2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.824319>.
- [164] J. Fu, Longitudinal Distribution, Migration and Transformation of PAHs in Soil, in: *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-19-4132-0_160.

- [165] H. Zhou, X. Gao, S. Wang, Y. Zhang, F. Coulon, C. Cai, Enhanced Bioremediation of Aged Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Using Immobilized Microbial Consortia Combined with Strengthening Remediation Strategies, *Int J Environ Res Public Health* 20 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijerph20031766>.
- [166] L. Xiang, J.D. Harindintwali, F. Wang, M. Redmile-Gordon, S.X. Chang, Y. Fu, C. He, B. Muhoza, F. Brahusi, N. Bolan, X. Jiang, Y.S. Ok, J. Rinklebe, A. Schaeffer, Y.G. Zhu, J.M. Tiedje, B. Xing, Integrating Biochar, Bacteria, and Plants for Sustainable Remediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants, *Environ Sci Technol* 56 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02976>.
- [167] M.B. Alao, E.A. Adebayo, Fungi as veritable tool in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-polluted wastewater, *J Basic Microbiol* 62 (2022). <https://doi.org/10.1002/jobm.202100376>.
- [168] S. Gupta, B. Pathak, Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): An Overview, in: *Bioremediation Technology*, 2020. <https://doi.org/10.1201/9780429296031-4>.
- [169] Q. Wang, S. Guo, M. Ali, X. Song, Z. Tang, Z. Zhang, M. Zhang, Y. Luo, Thermally enhanced bioremediation: A review of the fundamentals and applications in soil and groundwater remediation, *J Hazard Mater* 433 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128749>.
- [170] A. Gomes, J.H. Christensen, F. Gründger, K.U. Kjeldsen, S. Rysgaard, L. Vergeynst, Biodegradation of water-accommodated aromatic oil compounds in Arctic seawater at 0 °C, *Chemosphere* 286 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131751>.
- [171] K.L. Lau, Y.Y. Tsang, S.W. Chiu, Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples, *Chemosphere* 52 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00493-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00493-4).
- [172] R. Zainab, M. Hasnain, F. Ali, D.A. Dias, A. El-Keblawy, Z. Abideen, Exploring the bioremediation capability of petroleum-contaminated soils for enhanced environmental sustainability and minimization of ecotoxicological concerns, *Environmental Science and Pollution Research* 30 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29801-1>.
- [173] X. An, W. Li, J. Lan, X. Di, Study on the Desorption Behavior and Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Rocky Desertification Soils, *Pol J Environ Stud* 31 (2022). <https://doi.org/10.15244/pjoes/149999>.
- [174] D. Ghosal, S. Ghosh, T.K. Dutta, Y. Ahn, Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review, *Front Microbiol* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>.
- [175] A.O. Adeniji, K. Okaiyeto, M.J. George, E.B. Tanor, L. Semerjian, A.I. Okoh, A systematic assessment of research trends on polycyclic aromatic hydrocarbons in different environmental

- compartments using bibliometric parameters, *Environ Geochem Health* 45 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01353-2>.
- [176] P.J. Yesankar, M. Pal, A. Patil, A. Qureshi, Microbial exopolymeric substances and biosurfactants as ‘bioavailability enhancers’ for polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation, *International Journal of Environmental Science and Technology* 20 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04068-0>.
- [177] A. Krzyszczak, M.P. Dybowski, R. Zarzycki, R. Kobyłecki, P. Oleszczuk, B. Czech, Long-term physical and chemical aging of biochar affected the amount and bioavailability of PAHs and their derivatives, *J Hazard Mater* 440 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129795>.
- [178] O.P. Abioye, P. Agamuthu, A.R. Abdul Aziz, Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments, *Biotechnol Res Int* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/587041>.
- [179] P. Ghosh, S. Mukherji, Elucidation of substrate interaction effects in multicomponent systems containing 3-ring homocyclic and heterocyclic polynuclear aromatic hydrocarbons, *Environ Sci Process Impacts* 23 (2021). <https://doi.org/10.1039/d1em00140j>.
- [180] J.A. Adedeji, E.K. Tetteh, M. Opoku Amankwa, D. Asante-Sackey, S. Ofori-Frimpong, E.K. Armah, S. Rathilal, A.H. Mohammadi, M. Chetty, Microbial Bioremediation and Biodegradation of Petroleum Products—A Mini Review, *Applied Sciences (Switzerland)* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/app122312212>.
- [181] L. Luo, P. Wang, L. Lin, T. Luan, L. Ke, N.F.Y. Tam, Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae, *Process Biochemistry* 49 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.026>.
- [182] J. Deng, H. Wang, H. Zhan, C. Wu, Y. Huang, B. Yang, A. Mosa, W. Ling, Catalyzed degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by recoverable magnetic chitosan immobilized laccase from *Trametes versicolor*, *Chemosphere* 301 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134753>.
- [183] D.W. Lee, H. Lee, B.O. Kwon, J.S. Khim, U.H. Yim, B.S. Kim, J.J. Kim, Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment, *Environmental Pollution* 241 (2018) 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>.
- [184] T.G. Ambaye, F. Formicola, S. Scaffoni, A. Franzetti, M. Vaccari, Insights into rhamnolipid amendment towards enhancing microbial electrochemical treatment of petroleum hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere* 307 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136126>.

- [185] F. Ghanbari, F. Zirrahi, K.Y.A. Lin, B. Kakavandi, A. Hassani, Enhanced electro-peroxone using ultrasound irradiation for the degradation of organic compounds: A comparative study, *J Environ Chem Eng* 8 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104167>.
- [186] J.D. Aparicio, E.E. Raimondo, J.M. Saez, S.B. Costa-Gutierrez, A. Álvarez, C.S. Benimeli, M.A. Polti, The current approach to soil remediation: A review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination, *J Environ Chem Eng* 10 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107141>.
- [187] A. Hidangmayum, A. Debnath, A. Guru, B.N. Singh, S.K. Upadhyay, P. Dwivedi, Mechanistic and recent updates in nano-bioremediation for developing green technology to alleviate agricultural contaminants, *International Journal of Environmental Science and Technology* (2022). <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04560-7>.
- [188] A.K. Ahluwalia, B.S. Sekhon, Bioremediation: current scenario and a necessity in immediate future, *Environ Sci* 7 (2012) 349–364.
- [189] M.S. Akhtar, B. Chali, T. Azam, Bioremediation of Arsenic and Lead by Plants and Microbes from Contaminated Soil, *Research in Plant Sciences* 1 (2013) 68–73. <https://doi.org/10.12691/plant-1-3-4>.
- [190] M. Lin, X. Hu, W. Chen, H. Wang, C. Wang, Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp: BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil, *Int Biodeterior Biodegradation* 94 (2014) 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.011>.
- [191] K. Shaoping, D. Zhiwei, W. Bingchen, W. Huihui, L. Jialiang, S. Hongbo, Changes of sensitive microbial community in oil polluted soil in the coastal area in Shandong, China for ecorestoration, *Ecotoxicol Environ Saf* 207 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111551>.
- [192] M.S. Poorsoleiman, S.A. Hosseini, A. Etminan, H. Abtahi, A. Koolivand, Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons by Using a Two-Step Inoculation Composting Process Scaled-Up from a Mineral-Based Medium: Effect of Biostimulation of an Indigenous Bacterial Strain, *Waste Biomass Valorization* 12 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01140-z>.
- [193] O. Olawale, K.S. Obayomi, S.O. Dahunsi, O. Folarin, Bioremediation of artificially contaminated soil with petroleum using animal waste: cow and poultry dung, *Cogent Eng* 7 (2020). <https://doi.org/10.1080/23311916.2020.1721409>.
- [194] I.D. Behera, M. Nayak, A. Mishra, B.C. Meikap, R. Sen, Strategic implementation of integrated bioaugmentation and biostimulation for efficient mitigation of petroleum hydrocarbon pollutants from terrestrial and aquatic environment, *Mar Pollut Bull* 177 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113492>.

- [195] P.M. Fernández, S.C. Viñarta, A.R. Bernal, E.L. Cruz, L.I.C. Figueroa, Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives, *Chemosphere* 208 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.166>.
- [196] M. Halecký, E. Kozliak, Modern Bioremediation Approaches: Use of Biosurfactants, Emulsifiers, Enzymes, Biopesticides, GMOs, in: 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29840-1_24.
- [197] J.-S. Seo, Y.-S. Keum, Q.X. Li, Bacterial Degradation of Aromatic Compounds, *Int J Environ Res Public Health* 6 (2009) 278–309. <https://doi.org/10.3390/ijerph6010278>.
- [198] A. Nzila, Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria, *Environmental Pollution* 178 (2013) 474–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.042>.
- [199] R. Marchant, I.M. Banat, Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation, *Trends Biotechnol* 30 (2012) 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>.
- [200] S. Curiel-Alegre, B. Velasco-Arroyo, C. Rumbo, A.H.A. Khan, J.A. Tamayo-Ramos, C. Rad, J.L.R. Gallego, R. Barros, Evaluation of biostimulation, bioaugmentation, and organic amendments application on the bioremediation of recalcitrant hydrocarbons of soil, *Chemosphere* 307 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135638>.
- [201] A.H. Ali Khan, S. Tanveer, S. Alia, M. Anees, A. Sultan, M. Iqbal, S. Yousaf, Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation, *Ecol Eng* 104 (2017) 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.023>.
- [202] M. Wu, W. Li, W.A. Dick, X. Ye, K. Chen, D. Kost, L. Chen, Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination, *Chemosphere* 169 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>.
- [203] H. Yang, G. Kim, K.S. Cho, Bioaugmentation of diesel-contaminated soil with *Pseudomonas* sp. DTF1, *International Journal of Environmental Science and Technology* (2023). <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04846-4>.
- [204] X. Li, S. Wu, Y. Dong, H. Fan, Z. Bai, X. Zhuang, Engineering microbial consortia towards bioremediation, *Water (Switzerland)* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/w13202928>.
- [205] S. Mitri, E. Clarke, K.R. Foster, Resource limitation drives spatial organization in microbial groups, *ISME Journal* 10 (2016). <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.208>.
- [206] F. Suja, F. Rahim, M.R. Taha, N. Hambali, M. Rizal Razali, A. Khalid, A. Hamzah, Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations, *Int Biodeterior Biodegradation* 90 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>.

- [207] R.W. Ammeri, S. Kouki, W. Hassen, M. Oueslati, N. Sadfi-Zouaoui, A. Hassen, Bioaugmentation and phytoremediation wastewater treatment process as a viable alternative for pesticides removal: case of pentachlorophenol, *J Environ Health Sci Eng* (2023). <https://doi.org/10.1007/s40201-023-00865-y>.
- [208] C. Yaman, Performance and kinetics of bioaugmentation, biostimulation, and natural attenuation processes for bioremediation of crude oil-contaminated soils, *Processes* 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/PR8080883>.
- [209] N. Ballaminut Nara, K.M.G. Machado, L.H. dos Santos Oliveira, D.R. Matheus, Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57 (2014). <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402006>.
- [210] K.K. Yadav, J.K. Singh, N. Gupta, V. Kumar, A review of nanobioremediation technologies for environmental cleanup: A novel biological approach, *Journal of Materials and Environmental Science* 8 (2017).
- [211] V.D. Rajput, A. Singh, T. Minkina, S. Rawat, S. Mandzhieva, S. Sushkova, V. Shuvaeva, O. Nazarenko, P. Rajput, Komariah, K.K. Verma, A.K. Singh, M. Rao, S.K. Upadhyay, Nano-enabled products: Challenges and opportunities for sustainable agriculture, *Plants* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/plants10122727>.
- [212] H. El-Ramady, A. El-Henawy, M. Amer, A.E.-D. Omara, T. Elsakhawy, A.-M. Salama, A. Ezzat, A. Elsherif, M. Elmahrouk, T. Shalaby, Agro-Pollutants and their Nano-Remediation from Soil and Water: A Mini-Review, *Environment, Biodiversity and Soil Security* 0 (2020). <https://doi.org/10.21608/jenvbs.2020.47751.1111>.
- [213] M.I. Ghani, S. Saleem, S.A. Rather, M.S. Rehmani, S. Alamri, V.D. Rajput, H.M. Kalaji, N. Saleem, T.A. Sial, M. Liu, Foliar application of zinc oxide nanoparticles: An effective strategy to mitigate drought stress in cucumber seedling by modulating antioxidant defense system and osmolytes accumulation, *Chemosphere* 289 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133202>.
- [214] R. Kaur, S.S. Bhatti, S. Singh, J. Singh, S. Singh, Phytoremediation of Heavy Metals Using Cotton Plant: A Field Analysis, *Bull Environ Contam Toxicol* 101 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2472-8>.
- [215] P. Kumar, A. Kumar, R. Kumar, Phytoremediation and Nanoremediation, in: *New Frontiers of Nanomaterials in Environmental Science*, 2021. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9239-3_13.
- [216] N.H. Zulkernain, T. Uvarajan, C.C. Ng, Roles and significance of chelating agents for potentially toxic elements (PTEs) phytoremediation in soil: A review, *J Environ Manage* 341 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117926>.

- [217] A. Alemzadeh, Roles of plants and bacteria in bioremediation of petroleum in contaminated soils, in: *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_2.
- [218] Y.P. Tai, Y.F. Yang, Z.A. Li, Y. Yang, J.X. Wang, P. Zhuang, B. Zou, Phytoextraction of 55-year-old wastewater-irrigated soil in a Zn–Pb mine district: effect of plant species and chelators, *Environmental Technology (United Kingdom)* 39 (2018). <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1351493>.
- [219] N.L. Kindtler, F. Ekelund, R. Rønn, R. Kjølner, M. Hovmand, M. Vestergård, S. Christensen, J.L. Johansen, Wood ash effects on growth and cadmium uptake in *Deschampsia flexuosa* (Wavy hair-grass), *Environmental Pollution* 249 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.098>.
- [220] A. Ali, S.M. Shaheen, D. Guo, Y. Li, R. Xiao, F. Wahid, M. Azeem, K. Sohail, T. Zhang, J. Rinklebe, R. Li, Z. Zhang, Apricot shell- and apple tree-derived biochar affect the fractionation and bioavailability of Zn and Cd as well as the microbial activity in smelter contaminated soil, *Environmental Pollution* 264 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114773>.
- [221] M.J. Wang, G.D. Sheng, R. Wang, Progress in disposal technologies for plants polluted with heavy metals after phytoextraction, *Journal of Agricultural Resources and Environment* 38 (2021). <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0756>.
- [222] C.E. Rosenfeld, R.L. Chaney, C.E. Martínez, Soil geochemical factors regulate Cd accumulation by metal hyperaccumulating *Noccaea caerulea* (J. Presl & C. Presl) F.K. Mey in field-contaminated soils, *Science of the Total Environment* 616–617 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.016>.
- [223] M.M.A. Salam, E. Kaipainen, M. Mohsin, A. Villa, S. Kuittinen, P. Pulkkinen, P. Pelkonen, L. Mehtätalo, A. Pappinen, Effects of contaminated soil on the growth performance of young *Salix* (*Salix schwerinii* E. L. Wolf) and the potential for phytoremediation of heavy metals, *J Environ Manage* 183 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.082>.
- [224] A. Pilipović, R.S. Zalesny, S. Rončević, N. Nikolić, S. Orlović, J. Beljin, M. Katanić, Growth, physiology, and phytoextraction potential of poplar and willow established in soils amended with heavy-metal contaminated, dredged river sediments, *J Environ Manage* 239 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.072>.
- [225] W.S. Laidlaw, A.J.M. Baker, D. Gregory, S.K. Arndt, Irrigation water quality influences heavy metal uptake by willows in biosolids, *J Environ Manage* 155 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.005>.
- [226] X. Guo, M. Liu, H. Zhong, P. Li, C. Zhang, D. Wei, T. Zhao, Potential of *Myriophyllum aquaticum* for phytoremediation of water contaminated with tetracycline antibiotics and

- [227] H. Zhu, L. Chen, W. Xing, S. Ran, Z. Wei, M. Ameer, M. Wassie, H. Niu, D. Tang, J. Sun, D. Du, J. Yao, H. Hou, K. Chen, Phytohormones-induced senescence efficiently promotes the transport of cadmium from roots into shoots of plants: A novel strategy for strengthening of phytoremediation, *J Hazard Mater* 388 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122080>.
- [228] Z.Q. Liu, H.L. Li, X.J. Zeng, C. Lu, J.Y. Fu, L.J. Guo, W.M. Kimani, H.L. Yan, Z.Y. He, H.Q. Hao, H.C. Jing, Coupling phytoremediation of cadmium-contaminated soil with safe crop production based on a sorghum farming system, *J Clean Prod* 275 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123002>.
- [229] H. Wang, Y. Zhao, A. Muhammad, C. Liu, Q. Luo, H. Wu, X. Wang, X. Zheng, K. Wang, Y. Du, Influence of Celery on the Remediation of PAHs-contaminated Farm Soil, *Soil Sediment Contam* 28 (2019). <https://doi.org/10.1080/15320383.2018.1564732>.
- [230] N.T. Girkin, B.L. Turner, N. Ostle, J. Craigan, S. Sjögersten, Root exudate analogues accelerate CO₂ and CH₄ production in tropical peat, *Soil Biol Biochem* 117 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.11.008>.
- [231] X. Li, X. Wang, Y. Chen, X. Yang, Z. Cui, Optimization of combined phytoremediation for heavy metal contaminated mine tailings by a field-scale orthogonal experiment, *Ecotoxicol Environ Saf* 168 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.012>.
- [232] S. Lv, B. Yang, Y. Kou, J. Zeng, R. Wang, Y. Xiao, F. Li, Y. Lu, Y. Mu, C. Zhao, Assessing the difference of tolerance and phytoremediation potential in mercury contaminated soil of a non-food energy crop, *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem artichoke), *PeerJ* 2018 (2018). <https://doi.org/10.7717/peerj.4325>.
- [233] H. Ali, E. Khan, M. Anwar, Author's personal copy Chemosphere Phytoremediation of heavy metals — Concepts and applications, *Chemosphere* 91 (2013).
- [234] F. Guarino, A. Miranda, S. Castiglione, A. Ciatelli, Arsenic phytovolatilization and epigenetic modifications in *Arundo donax* L. assisted by a PGPR consortium, *Chemosphere* 251 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126310>.
- [235] M. Gavrilesco, Enhancing phytoremediation of soils polluted with heavy metals, *Curr Opin Biotechnol* 74 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.10.024>.
- [236] S.H. Awa, T. Hadibarata, Removal of Heavy Metals in Contaminated Soil by Phytoremediation Mechanism: a Review, *Water Air Soil Pollut* 231 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4426-0>.
- [237] C.J.S. Sampaio, J.R.B. de Souza, A.O. Damião, T.C. Bahiense, M.R.A. Roque, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a diesel oil-contaminated

- mangrove by plant growth-promoting rhizobacteria, 3 Biotech 9 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1686-8>.
- [238] C.S. Karigar, S.S. Rao, Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review, *Enzyme Res* 2011 (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/805187>.
- [239] A. Meliani, A. Bensoltane, Biofilm-Mediated Heavy Metals Bioremediation in PGPR *Pseudomonas*, *J Bioremediat Biodegrad* 7 (2016). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000370>.
- [240] A. Meliani, A. Bensoltane, Chemotaxis Behavior of *Pseudomonas* Species and Biodegradation of Pollutants, in: E. Lichtfouse (Ed.), *Sustainable Agriculture Reviews 31: Biocontrol*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 483–507. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94232-2_10.
- [241] A. Singh, S.M. Prasad, Remediation of heavy metal contaminated ecosystem: an overview on technology advancement, *International Journal of Environmental Science and Technology* 12 (2015) 353–366. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0542-y>.
- [242] G. Mustafa, S. Komatsu, Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1864 (2016) 932–944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.020>.
- [243] G. Rodríguez-Cutiño, J.J. Gaytán-Andrade, A. García-Cruz, R. Ramos-González, M.L. Chávez-González, E.P. Segura-Ceniceros, J.L. Martínez-Hernández, M. Govea-Salas, A. Ilyina, *Nanobiotechnology Approaches for Crop Protection, Phytobiont and Ecosystem Restitution* (2018) 1–21. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_1.
- [244] A. Iyer, K. Mody, B. Jha, Biosorption of heavy metals by a marine bacterium, *Mar Pollut Bull* 50 (2005) 340–343. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.012>.
- [245] A. Meliani, Bioremediation Strategies Employed by *Pseudomonas* Species, in: D.K. Maheshwari (Ed.), *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 351–383. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_14.
- [246] R.H. Peng, A.S. Xiong, Y. Xue, X.Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y.S. Tian, Q.H. Yao, Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiol Rev* 32 (2008) 927–955. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x>.
- [247] U. Deppe, H.-H. Richnow, W. Michaelis, G. Antranikian, Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium, *Extremophiles* 9 (2005) 461–470. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0463-2>.
- [248] I. Ghosh, J. Jasmine, S. Mukherji, Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge, *Bioresour Technol* 166 (2014) 548–558. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.074>.

- [249] S. Alagić, B.S. Maluckov, V.B. Radojičić, How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review, *Clean Technol Environ Policy* 17 (2015) 597–614. <https://doi.org/10.1007/s10098-014-0840-6>.
- [250] H.P. Bacosa, C. Inoue, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan, *J Hazard Mater* 283 (2015) 689–697. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.068>.
- [251] S.M. Bamforth, I. Singleton, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80 (2005) 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>.
- [252] T. Kobayashi, Y. Murai, K. Tatsumi, Y. Iimura, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. enhanced by water-extractable organic matter from manure compost, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 5805–5810. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.041>.
- [253] R. Tecon, J.R. Van Der Meer, Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037, *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (2010) 1131–1139. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2216-0>.
- [254] B. Tiwari, N. Manickam, S. Kumari, A. Tiwari, Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp., *Bioresour Technol* 216 (2016) 1102–1105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.047>.
- [255] A.A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnol Adv* 26 (2008) 246–265. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2007.12.005>.
- [256] S. Bahl, J. Dolma, J.J. Singh, S. Sehgal, Biodegradation of plastics: A state of the art review, *Mater Today Proc* 39 (2021) 31–34. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.06.096>.
- [257] R. Mohee, G. Unmar, Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments, *Waste Management* 27 (2007) 1486–1493. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.07.023>.
- [258] R. Geyer, J. Jambeck, K. Law, Production, Use, And Fate Of All Plastics Ever Made, *Sci Adv* 3 (2017) 25–29.
- [259] K. Kathiresan, Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil, *Revista de Biología-a Tropical* 51 (2003) 629–633. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442003000300003&nrm=iso.

- [260] Y. Zheng, E.K. Yanful, A.S. Bassi, A Review of Plastic Waste Biodegradation, *Crit Rev Biotechnol* 25 (2005) 243–250. <https://doi.org/10.1080/07388550500346359>.
- [261] I.F.H. Al-Jawhari, Heavy Metals, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Radioactive Materials, Xenobiotic, Pesticides, Hazardous Chemicals and Dyes Bioremediation, in: V. Kumar, M. Kumar, R. Prasad (Eds.), *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, Springer Singapore, Singapore, 2018: pp. 215–229. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_11.
- [262] A.J. Das, R. Kumar, Bioremediation of petroleum contaminated soil to combat toxicity on *Withania somnifera* through seed priming with biosurfactant producing plant growth promoting rhizobacteria, *J Environ Manage* 174 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.031>.
- [263] A. Chopra, S. Bobate, P. Rahi, A. Banpurkar, P.B. Mazumder, S. Satpute, *Pseudomonas aeruginosa* RTE4: A Tea *Rhizobacterium* With Potential for Plant Growth Promotion and Biosurfactant Production, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00861>.
- [264] A. Kashtiaray, A. Khadir, A.N. Ardestani, N. Salehpour, Biosurfactants and sustainable multifunctional biocompounds for wastewater remediation, in: *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Biosurfactants for the Bioremediation of Polluted Environments*, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822696-4.00015-2>.
- [265] S. Rastogi, S. Tiwari, S. Ratna, R. Kumar, Screening of Biosurfactant Producing Bacteria Isolated from Hydrocarbon Contaminated Site and Their Potential in Biosorption of Pb(II) and Oil Biodegradation, *Bioresour Technol Rep* 15 (2021) 100706. <https://doi.org/10.1515/tsd-2020-2341>.
- [266] S. Mishra, Z. Lin, S. Pang, Y. Zhang, P. Bhatt, S. Chen, Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils, *J Hazard Mater* 418 (2021) 126253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>.
- [267] S. Varjani, P. Rakholiya, H. Yong Ng, M.J. Taherzadeh, H. Hao Ngo, J.S. Chang, J.W.C. Wong, S. You, J.A. Teixeira, X.T. Bui, Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives, *Bioresour Technol* 319 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124213>.
- [268] E.J. Gudiña, J.A. Teixeira, *Bacillus licheniformis*: The unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants?, *Biotechnol Adv* 60 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108013>.
- [269] R. Jahan, A.M. Bodratti, M. Tsianou, P. Alexandridis, Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications, *Adv Colloid Interface Sci* 275 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>.

- [270] M. Xu, X. Fu, Y. Gao, L. Duan, C. Xu, W. Sun, Y. Li, X. Meng, X. Xiao, Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation, *J Environ Chem Eng* 8 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104277>.
- [271] A.A. Jimoh, J. Lin, Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability, *Ecotoxicol Environ Saf* 184 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>.
- [272] D. Sharma, B.S. Saharan, S. Kapil, Structural Properties of Biosurfactants of Lab, in: *Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 47–60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26215-4_4.
- [273] Z. Ahmad, D. Crowley, M. Arshad, M. Imran, Biosurfactants and Bioemulsifiers for Treatment of Industrial Wastes, in: *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*, 2015: pp. 127–154. <https://doi.org/10.1201/b18218-6>.
- [274] M. Rajkumar, S. Sandhya, M.N.V. Prasad, H. Freitas, Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation, *Biotechnol Adv* 30 (2012) 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>.
- [275] E.J. Gudiña, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications, *Mar Drugs* 14 (2016). <https://doi.org/10.3390/md14020038>.
- [276] S. Vijayakuma, V. Saravanan, Biosurfactants-Types, Sources and Applications, *Res J Microbiol* 10 (2015) 181–192. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>.
- [277] E. Rosenberg, E.Z. Ron, High- and low-molecular-mass microbial surfactants, *Appl Microbiol Biotechnol* (1999). <https://doi.org/10.1007/s002530051502>.
- [278] G.A. Płaza, J. Chojniak, I.M. Banat, Biosurfactant Mediated Biosynthesis of Selected Metallic Nanoparticles, *Int J Mol Sci* 15 (2014) 13720–13737. <https://doi.org/10.3390/ijms150813720>.
- [279] I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant, Microbial biosurfactants production, applications and future potential, *Appl Microbiol Biotechnol* 87 (2010) 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>.
- [280] W. Blyth, E. Shahsavari, P.D. Morrison, A.S. Ball, Biosurfactant from red ash trees enhances the bioremediation of PAH contaminated soil at a former gasworks site, *J Environ Manage* 162 (2015) 30–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.041>.
- [281] C.N. Mulligan, R.N. Yong, B.F. Gibbs, Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review, *Eng Geol* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4).
- [282] A.M. Abdel-Mawgoud, R. Hausmann, F. Lépine, M.M. Müller, E. Déziel, Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production, in:

- G. Soberón-Chávez (Ed.), *Biosurfactants: From Genes to Applications*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011: pp. 13–55. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_2.
- [283] M.M. Müller, J.H. Kügler, M. Henkel, M. Gerlitzki, B. Hörmann, M. Pöhnlein, C. Syltdat, R. Hausmann, Rhamnolipids-Next generation surfactants?, *J Biotechnol* 162 (2012) 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>.
- [284] M.A. Díaz De Rienzo, I.M. Banat, B. Dolman, J. Winterburn, P.J. Martin, Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent, *N Biotechnol* 32 (2015) 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.02.009>.
- [285] H.L. Lydon, N. Baccile, B. Callaghan, R. Marchant, C.A. Mitchell, I.M. Banat, Adjuvant Antibiotic Activity of Acidic Sophorolipids with Potential for Facilitating Wound Healing, *Antimicrob Agents Chemother* 61 (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.02547-16>.
- [286] A. Franzetti, E. Tamburini, I.M. Banat, Applications of biological surface active compounds in remediation technologies, *Adv Exp Med Biol* 672 (2010). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_9.
- [287] P. Das, S. Mukherjee, R. Sen, Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview, *Biotechnol Genet Eng Rev* 25 (2008) 165–186. <https://doi.org/10.5661/bger-25-165>.
- [288] G. Seydlová, J. Svobodová, Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications, *Cent Eur J Med* 3 (2008) 123–133. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5>.
- [289] F.A. Bezza, E.M.N. Chirwa, Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain, *J Hazard Mater* 321 (2017) 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.035>.
- [290] H.J. Rehm, I. Reiff, MECHANISMS AND OCCURRENCE OF MICROBIAL OXIDATION OF LONG-CHAIN ALKANES., *Advances in Biochemical Engineering* 19 (1981) 175–215. https://doi.org/10.1007/3-540-10464-x_18.
- [291] M.C. Cirigliano, G.M. Carman, Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl Environ Microbiol* 50 (1985). <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.846-850.1985>.
- [292] H.-R. Ahmadi-Ashtiani, A. Baldisserotto, E. Cesa, S. Manfredini, H. Sedghi Zadeh, M. Ghafori Gorab, M. Khanahmadi, S. Zakizadeh, P. Buso, S. Vertuani, Microbial Biosurfactants as Key Multifunctional Ingredients for Sustainable Cosmetics, *Cosmetics* 7 (2020) 46. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020046>.

- [293] M. Nakano, S. Iehata, R. Tanaka, H. Maeda, Extracellular neutral lipids produced by the marine bacteria *Marinobacter* sp., *Biocontrol Sci* 17 (2012) 69–75. <https://doi.org/10.4265/bio.17.69>.
- [294] K.K. Gautam, V.K. Tyagi, Microbial Surfactants: A Review, *J Oleo Sci* 55 (2006) 155–166. <https://doi.org/10.5650/jos.55.155>.
- [295] E.O. Fenibo, G.N. Ijoma, R. Selvarajan, C.B. Chikere, Microbial Surfactants: The Next Generation Multifunctional Biomolecules for Applications in the Petroleum Industry and Its Associated Environmental Remediation, *Microorganisms* 7 (2019) 581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>.
- [296] P. Suwansukho, V. Rukachisirikul, F. Kawai, A. H-Kittikun, Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4, *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30 (2008) 87–93.
- [297] E. Antoniou, S. Fodelianakis, E. Korkakaki, N. Kalogerakis, Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source, *Front Microbiol* 6 (2015) 274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00274>.
- [298] R. Kumar, A.J. Das, Production of Rhamnolipids, in: *Rhamnolipid Biosurfactant*, Springer Singapore, Singapore, 2018: pp. 29–41. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1289-2_3.
- [299] S. Shekhar, A. Sundaramanickam, T. Balasubramanian, Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review, *Crit Rev Environ Sci Technol* 45 (2015) 1522–1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>.
- [300] R.M. Atlas, Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation, *Mar Pollut Bull* 31 (1995) 178–182. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00113-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00113-2).
- [301] C.P. Kurtzman, N.P.J. Price, K.J. Ray, T.M. Kuo, Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade, *FEMS Microbiol Lett* 311 (2010) 140–146. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02082.x>.
- [302] I. Van Bogaert, S. Fleurackers, S. Van Kerrebroeck, D. Develter, W. Soetaert, Production of new-to-nature sophorolipids by cultivating the yeast *Candida bombicola* on unconventional hydrophobic substrates, *Biotechnol Bioeng* 108 (2011) 734–741. <https://doi.org/10.1002/bit.23004>.
- [303] R. Anandan, D. Dharumadurai, An Introduction to Actinobacteria, in: *Actinobacteria Basics and Biotechnological Applications*, 2016: pp. 3–37. <http://dx.doi.org/10.5772/62329>.
- [304] L. Magalhães, M. Nitschke, Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin, *Food Control* 29 (2013) 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009>.

- [305] H.B. de S. Sobrinho, J.M. de Luna, R.D. Rufino, A.L.F. Porto, L.A. Sarubbo, Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor, *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (2013). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-4>.
- [306] R. de C.F.S. Silva, D.G. Almeida, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *Int J Mol Sci* 15 (2014) 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>.
- [307] H.R. Dash, N. Mangwani, J. Chakraborty, S. Kumari, S. Das, Marin bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 97 (2013) 561–571.
- [308] R. Raj, S. Das, N. Mangwani, N. Innovation, H.R. Dash, Heavy Metals and Hydrocarbons: Adverse Effects and Mechanisms of Toxicity, in: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2014: pp. 23–54.
- [309] M.L. Dotaniya, S. Rajendiran, C.K. Dotaniya, P. Solanki, V.D. Meena, J.K. Saha, A.K. Patra, Microbial Assisted Phytoremediation for Heavy Metal Contaminated Soils, in: V. Kumar, M. Kumar, R. Prasad (Eds.), *Phytobiont and Ecosystem Restitution*, Springer Singapore, Singapore, 2018: pp. 295–317. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1187-1_16.
- [310] P.B. Tehounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, Heavy metal toxicity and the environment, *Exp Suppl* 101 (2012) 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- [311] A. Singh, J.D. Van Hamme, O.P. Ward, Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, *Biotechnol Adv* 25 (2007) 99–121.
- [312] N.M. Venkatesh, N. Vedaraman, Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil, *Ann Microbiol* 62 (2012) 85–91.
- [313] A.A. Juwarkar, A. Nair, K.V. Dubey, S.K. Singh, S. Devotta, Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils, *Chemosphere* 10 (2007) 1996–2002.
- [314] M.E.-A. Bendaha, B. Meddah, H.A. Belaouni, M. Mokhtar, A. Tirtouil, Removal of zinc and cadmium ions from contaminated soils with rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5, *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 8 (2016) 1146–1165.
- [315] D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century, *Int J Mol Sci* 17 (2016) 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.
- [316] X. Sheng, L. He, Q. Wang, H. Ye, C. Jiang, Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil, *J Hazard Mater* 155 (2008) 17–22.

- [317] D.C. Wolf, J. Gan, Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactant on 14C-Pyrene mineralization in soil, *Environmental Pollution* 243 (2018) 1846–1853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.031>.
- [318] W. Xia, Z. Du, Q. Cui, H. Dong, F. Wang, P. He, Y. Tang, Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons, *J Hazard Mater* 276 (2014) 489–498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.062>.
- [319] A. Aparna, G. Srinikethan, H. Smitha, Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B, *Colloids Surf B Biointerfaces* 95 (2012) 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>.
- [320] A. Aparna, H. Smitha, G. Srinikethan, Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* sps. on Biodegradation of Crude Oil, 2nd International Conference on Environmental Science and Technology 6 (2011) 71–75. <http://www.ipcbee.com/vol6/no1/15-F00028.pdf>.
- [321] L. Lawniczak, R. Marecik, L. Chrzanowski, Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 6 (2013) 2327–2339.
- [322] A.C. Adrion, J. Nakamura, D. Shea, M.D. Aitken, Screening Nonionic Surfactants for Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Remaining in Soil After Conventional Biological Treatment, *Environ Sci Technol* 50 (2016) 3838–3845. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05243>.
- [323] M. Pacwa-Płociniczak, G.A. Płaza, Z. Piotrowska-Seget, S.S. Cameotra, Environmental applications of biosurfactants: Recent advances, *Int J Mol Sci* 12 (2011) 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>.
- [324] S. Kumari, R.K. Regar, N. Manickam, Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria, *Bioresour Technol* 254 (2018) 174–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>.
- [325] E. Kaczorek, A. Pacholak, A. Zdarta, W. Smulek, The Impact of Biosurfactants on Microbial Cell Properties Leading to Hydrocarbon Bioavailability Increase, *Colloids and Interfaces* 2 (2018) 35. <https://doi.org/10.3390/colloids2030035>.
- [326] R. Marchant, I.M. Banat, Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation, *Trends Biotechnol* 30 (2012) 558–565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>.
- [327] I.M. Banat, Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresour Technol* 51 (1995) 1–12.

- [328] I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra, Potential commercial applications of microbial surfactants., *Appl Microbiol Biotechnol* 53 (2000) 495–508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10855707>.
- [329] H. Amani, M.H. Sarrafzadeh, M. Haghghi, M.R. Mehrnia, Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, *J Pet Sci Eng* 75 (2010) 209–214.
- [330] V. Alvarez, D. Jurelevicius, J. Marques, *Bacillus amylolique-faciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery, *Colloids Surf B Biointerfaces* 136 (2015) 14–21.
- [331] S.J. Geetha, I.M. Banat, S.J. Joshi, Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR), *Biocatal Agric Biotechnol* 14 (2018) 23–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>.
- [332] J.M.D.A. Câmara, M.A.S.B. Sousa, E.L. Barros Neto, M.C.A. Oliveira, Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR), *J Pet Explor Prod Technol* 9 (2019) 2333–2341. <https://doi.org/10.1007/s13202-019-0633-x>.
- [333] R. Marchant, I.M. Banat, Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation, *Trends Biotechnol* 30 (2012) 558–565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>.
- [334] N. Youssef, M.S. Elshahed, M.J. McInerney, Microbial Processes in Oil Fields: Culprits, Problems, and Opportunities, *Adv. Appl. Microbiol* 66 (2009) 141–251. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00806-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00806-X).
- [335] F. Zhao, J. Zhang, R. Shi, S. Han, F. Ma, Y. Zhang, Production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* isolate and its applicability to in situ microbial enhanced oil recovery under anoxic conditions, *RSC Adv.* 5 (2015) 36044–36050. <https://doi.org/10.1039/C5RA03559G>.
- [336] N. Youssef, D.R. Simpson, K.E. Duncan, M.J. McInerney, M. Folmsbee, T. Fincher, R.M. Knapp, In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir, *Appl Environ Microbiol* 73 (2007) 1239 LP – 1247. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264-06>.
- [337] N. Youssef, D.R. Simpson, M.J. McInerney, K.E. Duncan, In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production, *Int Biodeterior Biodegradation* 81 (2013) 127–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.010>.
- [338] J.D. Albino, I.M. Nambi, Partial Characterization of Biosurfactant Produced under Anaerobic Conditions by *Pseudomonas* sp ANBIOSURF-1, *Adv Mat Res* 93–94 (2010) 623–626. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.93-94.623>.

- [339] H.T. Wattanaphon, A. Kerdsin, C. Thammacharoen, P. Sangvanich, A.S. Vangnai, A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization, *J Appl Microbiol* 105 (2008) 416–423.
- [340] A. López-Prieto, A.B. Moldes, J.M. Cruz, B. Pérez Cid, Towards more Ecofriendly Pesticides: Use of Biosurfactants Obtained from the Corn Milling Industry as Solubilizing Agent of Copper Oxychloride, *J Surfactants Deterg* 23 (2020) 1055–1066. <https://doi.org/10.1002/jsde.12463>.
- [341] J.Z. Wan, D. Meng, T. Long, R.R. Ying, M. Ye, S.T. Zhang, Q. Li, Y. Zhou, Y.S. Lin, Simultaneous removal of lindane, lead and cadmium from soils by rhamnolipids combined with citric acid, *PLoS One* 10 (2015) ARTN e0129978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129978>.
- [342] A.M. Nair, S. Rebello, K.S. Rishad, A.K. Asok, M.S. Jisha, Biosurfactant Facilitated Biodegradation of Quinalphos at High Concentrations by *Pseudomonas aeruginosa* Q10, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 24 (2015) 542–553. <https://doi.org/10.1080/15320383.2015.988205>.
- [343] C. Lamilla, H. Schalchli, G. Briceño, B. Leiva, P. Donoso-Piñol, L. Barrientos, V.A.L. Rocha, D.M.G. Freire, M. Cristina Diez, E. Romero Taboada, R. Nogales Vargas-Machuca, A Pesticide Biopurification System: A Source of Biosurfactant-Producing Bacteria with Environmental Biotechnology Applications, (2021). <https://doi.org/10.3390/agronomy11040624>.
- [344] S.M. Awada, M.M. Awada, R.S. Spendlove, Compositions and methods for controlling pests with glycolipids, 2014.
- [345] I. Mnif, D. Ghribi, Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry, *J Sci Food Agric* 96 (2016) 4310–4320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7759>.
- [346] A. Chebbi, A. Franzetti, F. Duarte Castro, F.H. Gomez Tovar, M. Tazzari, S. Scaffoni, M. Vaccari, Potentials of Winery and Olive Oil Residues for the Production of Rhamnolipids and Other Biosurfactants: A Step Towards Achieving a Circular Economy Model, *Waste Biomass Valorization* 12 (2021) 4733–4743. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01315-8>.
- [347] R. Kumar, A.J. Das, Production of Rhamnolipids, in: *Rhamnolipid Biosurfactant*, Springer Singapore, 2018: pp. 29–41. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1289-2_3.
- [348] S. Rastogi, S. Tiwari, S. Ratna, R. Kumar, Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its synergistic application in biosorption of Pb²⁺, *Bioresour Technol Rep* 15 (2021) 100706. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100706>.

- [349] M. Elshikh, S. Funston, A. Chebbi, S. Ahmed, R. Marchant, I.M. Banat, Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens, *N Biotechnol* 36 (2017) 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>.
- [350] A. Chebbi, M. Elshikh, F. Haque, S. Ahmed, S. Dobbin, R. Marchant, S. Sayadi, M. Chamkha, I.M. Banat, Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection, *J Basic Microbiol* 57 (2017) 364–375. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600658>.
- [351] F. Zhao, R. Shi, F. Ma, S. Han, Y. Zhang, Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microb Cell Fact* 17 (2018) 39. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0888-9>.
- [352] L. Dobler, L.F. Vilela, R. V. Almeida, B.C. Neves, Rhamnolipids in perspective: Gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting, *N Biotechnol* 33 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>.
- [353] A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lepine, E. Deziel, Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles, *Appl Microbiol Biotechnol* 86 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>.
- [354] F. Bredenbruch, M. Nimtz, V. Wray, M. Morr, R. Muller, S. Haussler, Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines, *J Bacteriol* 187 (2005). <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3630-3635.2005>.
- [355] K. Zhu, C.O. Rock, RhlA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol* 190 (2008). <https://doi.org/10.1128/JB.00080-08>.
- [356] Y. Kang, J. Zarzycki-Siek, C.B. Walton, M.H. Norris, P. Videau, M. Son, T.T. Hoang, Correction: Multiple FadD Acyl-CoA Synthetases Contribute to Differential Fatty Acid Degradation and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One* 5 (2010). <https://doi.org/10.1371/annotation/a55051c6-25dc-4548-912e-bf339830668e>.
- [357] A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, E. Déziel, A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants, *Chem Biol* 21 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.010>.
- [358] E. Déziel, F. Lépine, S. Milot, R. Villemur, rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids, *Microbiology (N Y)* 149 (2003). <https://doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>.

- [359] C. Olvera, J.B. Goldberg, R. Sánchez, G. Soberón-Chávez, The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis, FEMS Microbiol Lett 179 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00381-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00381-X).
- [360] T.H. Pham, J.S. Webb, B.H.A. Rehm, The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation, Microbiology (N Y) 150 (2004). <https://doi.org/10.1099/mic.0.27357-0>.
- [361] R.S. Reis, A.G. Pereira, B.C. Neves, D.M. Freire, Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* a review, Bioresour Technol 102 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.074>.
- [362] G. Soberón-Chávez, A. González-Valdez, M.P. Soto-Aceves, M. Cocotl-Yañez, Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market, Microb Biotechnol 14 (2021). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>.
- [363] S. García-Reyes, G. Soberón-Chávez, M. Cocotl-Yañez, The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein, J Med Microbiol 69 (2020). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>.
- [364] P. Williams, M. Cámara, Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules, Curr Opin Microbiol 12 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>.
- [365] V. Dekimpe, E. Deziel, Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors, Microbiology (N Y) 155 (2009). <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>.
- [366] G. Rampioni, F. Polticelli, I. Bertani, K. Righetti, V. Venturi, E. Zennaro, L. Leoni, The *Pseudomonas* quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins, J Bacteriol 189 (2007). <https://doi.org/10.1128/JB.01552-06>.
- [367] J.W. Schertzer, M.L. Boulette, M. Whiteley, More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules, Trends Microbiol 17 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.001>.
- [368] L.A. Gallagher, S.L. McKnight, M.S. Kuznetsova, E.C. Pesci, C. Manoil, Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*, J Bacteriol 184 (2002). <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6472-6480.2002>.
- [369] S.P. Diggle, K. Winzer, S.R. Chhabra, K.E. Worrall, M. Cámara, P. Williams, The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR, Mol Microbiol 50 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x>.

- [370] G. Medina, K. Juárez, R. Díaz, G. Soberón-Chávez, Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein, *Microbiology (N Y)* 149 (2003). <https://doi.org/10.1099/mic.0.26282-0>.
- [371] M. Schuster, E.P. Greenberg, Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon, *BMC Genomics* 8 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-287>.
- [372] Y. Lequette, J.H. Lee, F. Ledgham, A. Lazdunski, E.P. Greenberg, A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit, *J Bacteriol* 188 (2006). <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3365-3370.2006>.
- [373] F. Ledgham, I. Ventre, C. Soscia, M. Foglino, J.N. Sturgis, A. Lazdunski, Interactions of the quorum sensing regulator QscR: Interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR, *Mol Microbiol* 48 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03423.x>.
- [374] A. Chebbi, A. Franzetti, F. Formicola, T.G. Ambaye, F.H. Gomez, B. Murena, E. De Marco, T. Beltrani, S. Scaffoni, M. Vaccari, Insights into rhamnolipid-based soil remediation technologies by safe microorganisms: A critical review, *J Clean Prod* 367 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133088>.
- [375] B.C. Stark, K.R. Pagilla, K.L. Dikshit, Recent applications of *Vitreoscilla hemoglobin* technology in bioproduct synthesis and bioremediation, *Appl Microbiol Biotechnol* 99 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6350-y>.
- [376] H. Kahraman, S.O. Erenler, Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* engineered with the *Vitreoscilla hemoglobin* gene, *Appl Biochem Microbiol* 48 (2012). <https://doi.org/10.1134/S000368381202007X>.
- [377] P. Tielen, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.E. Jaeger, H.C. Flemming, J. Wingender, Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology (N Y)* 156 (2010). <https://doi.org/10.1099/mic.0.037036-0>.
- [378] S. Wilhelm, A. Gdynia, P. Tielen, F. Rosenau, K.E. Jaeger, The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation, *J Bacteriol* 189 (2007). <https://doi.org/10.1128/JB.00023-07>.
- [379] F. Rosenau, S. Isenhardt, A. Gdynia, D. Tielker, E. Schmidt, P. Tielen, M. Schobert, D. Jahn, S. Wilhelm, K.E. Jaeger, Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol Lett* 309 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02017.x>.
- [380] R. Kumar, R.I. Barbhuiya, V. Bohra, J.W.C. Wong, A. Singh, G. Kaur, Sustainable rhamnolipids production in the next decade – Advancing with *Burkholderia thailandensis* as a

- potent biocatalytic strain, *Microbiol Res* 272 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127386>.
- [381] F. Zhao, M. Mandlaa, J. Hao, X. Liang, R. Shi, S. Han, Y. Zhang, Optimization of culture medium for anaerobic production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl for microbial enhanced oil recovery, *Lett Appl Microbiol* 59 (2014).
<https://doi.org/10.1111/lam.12269>.
- [382] J. Toribio, A.E. Escalante, G. Soberón-Chávez, Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*, *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (2010). <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900256>.
- [383] O. Frank Anayo, E. Chika Scholastica, O. Chidi Peter, U. Gray Nneji, A. Obinna, L. Oluwabusola Mistura, The Beneficial Roles of *Pseudomonas* in Medicine, Industries, and Environment: A Review , in: *Pseudomonas Aeruginosa - An Armory Within*, 2019.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.85996>.
- [384] D. Hentati, A. Chebbi, F. Hadrich, I. Frikha, F. Rabanal, S. Sayadi, A. Manresa, M. Chamkha, Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5, *Ecotoxicol Environ Saf* 167 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>.
- [385] S. Nalini, S. Sathiyamurthi, T.S. Dhas, M. Revathi, Lipopeptide and Rhamnolipid Biosurfactant as Biopesticides, in: *Multifunctional Microbial Biosurfactants*, 2023.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-31230-4_8.
- [386] V.K. Gaur, A. Bajaj, R.K. Regar, M. Kamthan, R.R. Jha, J.K. Srivastava, N. Manickam, Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain IITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides, *Bioresour Technol* 272 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.144>.
- [387] V.K. Gaur, V. Tripathi, P. Gupta, N. Dhiman, R.K. Regar, K. Gautam, J.K. Srivastava, S. Patnaik, D.K. Patel, N. Manickam, Rhamnolipids from *Planococcus* spp. and their mechanism of action against pathogenic bacteria, *Bioresour Technol* 307 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123206>.
- [388] N.F. Curiel-Maciel, F. Martínez-Morales, A.F. Licea-Navarro, B. Bertrand, A.B. Aguilar-Guadarrama, N.S. Rosas-Galván, D. Morales-Guzmán, N. Rivera-Gómez, R.M. Gutiérrez-Ríos, M.R. Trejo-Hernández, Characterization of *Enterobacter cloacae* BAGM01 Producing a Thermostable and Alkaline-Tolerant Rhamnolipid Biosurfactant from the Gulf of Mexico, *Marine Biotechnology* 23 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10126-020-10006-3>.
- [389] V. Segovia, A. Reyes, G. Rivera, P. Vázquez, G. Velazquez, A. Paz-González, R. Hernández-Gama, Production of rhamnolipids by the *Thermoanaerobacter* sp. CM-CNRG TB177 strain

- isolated from an oil well in Mexico, *Appl Microbiol Biotechnol* 105 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11468-8>.
- [390] J. Cao, W. Wang, Z. Zhao, X. Liu, Q.X. Li, Genome, metabolic pathways and characteristics of cometabolism of dibenzothiophene and the biodiesel byproduct glycerol in *Paraburkholderia* sp. C3, *Bioresour Technol* 326 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124699>.
- [391] J. Correia, E.J. Gudiña, Z. Lazar, T. Janek, J.A. Teixeira, Cost-effective rhamnolipid production by *Burkholderia thailandensis* E264 using agro-industrial residues, *Appl Microbiol Biotechnol* 106 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12225-1>.
- [392] A. Chebbi, M. Tazzari, C. Rizzi, F.H. Gomez Tovar, S. Villa, S. Scaffoni, M. Vaccari, A. Franzetti, *Burkholderia thailandensis* E264 as a promising safe rhamnolipids' producer towards a sustainable valorization of grape marcs and olive mill pomace, *Appl Microbiol Biotechnol* 105 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11292-0>.
- [393] M.S. Twigg, N. Baccile, I.M. Banat, E. Déziel, R. Marchant, S. Roelants, I.N.A. Van Bogaert, Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development, *Microb Biotechnol* 14 (2021). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>.
- [394] L.A. Sarubbo, M. da G.C. Silva, I.J.B. Durval, K.G.O. Bezerra, B.G. Ribeiro, I.A. Silva, M.S. Twigg, I.M. Banat, Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives, *Biochem Eng J* 181 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.
- [395] I.M. Banat, S.K. Satpute, S.S. Cameotra, R. Patil, N. V. Nyayanit, Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production, *Front Microbiol* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>.
- [396] B. Kaskatepe, S. Yildiz, Rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas* Species, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59 (2016) 1–16.
- [397] K. Patowary, R. Patowary, M.C. Kalita, S. Deka, Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon, *Front Microbiol* 8 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279>.
- [398] K. Eddouaouda, S. Mnif, A. Badis, S. Ben Younes, S. Cherif, S. Ferhat, N. Mhiri, M. Chamkha, S. Sayadi, Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation, *J Basic Microbiol* 52 (2012) 408–418. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100268>.
- [399] S.Y. Chen, Y.H. Wei, J.S. Chang, Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2, *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0980-2>.

- [400] S.Y. Clien, W. Bin Lu, Y.H. Wei, W.M. Chen, J.S. Chang, Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2, *Biotechnol Prog* 23 (2007). <https://doi.org/10.1021/bp0700152>.
- [401] A.S. Pathania, A.K. Jana, Improvement in Production of Rhamnolipids Using Fried Oil with Hydrophilic Co-substrate by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* NJ2 and Characterizations, *Appl Biochem Biotechnol* 191 (2020) 1223–1246. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03221-9>.
- [402] M.I. Maqsood, A. Jamal, Factors affecting the rhamnolipid biosurfactant production, *Pakistan Journal of Biotechnology* 8 (2011) 1–5.
- [403] A. Tahzibi, F. Kamal, M.M. Assadi, Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant, *Iran Biomed J* 8 (2004).
- [404] Y. Sun, Z. Zhang, L. Liu, X. Xu, X. Li, Effects of Various Phosphates on Biosurfactant Fermentation by *Ochrobactrum Intermedium* XY-1, in: *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 2021. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/706/1/012042>.
- [405] S.J. Varjani, V.N. Upasani, Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant, *Bioresour Technol* 232 (2017) 389–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>.
- [406] M. Abouseoud, R. Maachi, A. Amrane, Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (2007) 340–347.
- [407] S.J. Varjani, V.N. Upasani, Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant, *Bioresour Technol* 221 (2016) 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.080>.
- [408] S. Haloi, S. Sarmah, S.B. Gogoi, T. Medhi, Characterization of *Pseudomonas* sp. TMB2 produced rhamnolipids for ex-situ microbial enhanced oil recovery, *3 Biotech* 10 (2020) 120. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2094-9>.
- [409] W.A. Eraqi, A.S. Yassin, A.E. Ali, M.A. Amin, Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*, *Biotechnol Res Int* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/3464509>.
- [410] Y.-H. Wei, C.-L. Chou, J.-S. Chang, Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater, *Biochem Eng J* 27 (2005) 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.028>.

- [411] F.J.S. Oliveira, L. Vazquez, N.P. de Campos, F.P. de França, Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain, *Process Biochemistry* 44 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.014>.
- [412] S.N.R.L. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, *Colloids Surf B Biointerfaces* 79 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>.
- [413] T.A.A. Moussa, M.S. Mohamed, N. Samak, Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 31 (2014). <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140314s00002473>.
- [414] E.J. Gudiña, A.I. Rodrigues, V. de Freitas, Z. Azevedo, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids, *Bioresour Technol* 212 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>.
- [415] S.S. Mohanty, Y. Koul, S. Varjani, A. Pandey, H.H. Ngo, J.S. Chang, J.W.C. Wong, X.T. Bui, A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production, *Microb Cell Fact* 20 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>.
- [416] Á. Domínguez Rivera, M.Á. Martínez Urbina, V.E. López y López, Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production, *World J Microbiol Biotechnol* 35 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>.
- [417] W. Begum, B. Saha, U. Mandal, A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development, *RSC Adv* 13 (2023) 25599–25615. <https://doi.org/10.1039/d3ra05051c>.
- [418] S. Varjani, D.J. Lee, Q. Zhang, Valorizing agricultural biomass for sustainable development: biological engineering aspects, *Bioengineered* 11 (2020). <https://doi.org/10.1080/2165979.2020.1759185>.
- [419] E.R. Rene, J. Ge, G. Kumar, R.P. Singh, S. Varjani, Resource recovery from wastewater, solid waste, and waste gas: engineering and management aspects, *Environmental Science and Pollution Research* 27 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08802-4>.
- [420] V.K. de Oliveira Schmidt, J. de Souza Carvalho, D. de Oliveira, C.J. de Andrade, Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview, *World J Microbiol Biotechnol* 37 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8>.
- [421] A.J. Das, R. Kumar, Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil, *Environ Technol Innov* 16 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100450>.

- [422] P. Sharma, V.K. Gaur, S.H. Kim, A. Pandey, Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources, *Bioresour Technol* 299 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122580>.
- [423] K. Bhangе, V. Chaturvedi, R. Bhatt, Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste, *Biotechnology Reports* 10 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.007>.
- [424] J. Gurjar, B. Sengupta, Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423, *Bioresour Technol* 189 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.013>.
- [425] A.J. Das, R. Kumar, Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix, *Bioresour Technol* 260 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.093>.
- [426] A.M. Eldin, Z. Kamel, N. Hossam, Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods, *Microchemical Journal* 146 (2019) 309–314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.020>.
- [427] K. Kaur, S. Sangwan, H. Kaur, Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments, *Environ Monit Assess* 189 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6311-x>.
- [428] I. Moya Ramírez, K. Tsaousi, M. Rudden, R. Marchant, E. Jurado Alameda, M. García Román, I.M. Banat, Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source, *Bioresour Technol* 198 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.012>.
- [429] N.M.P. Rocha e Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates, *Biocatal Agric Biotechnol* 3 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005>.
- [430] D. Cieurko, A. Chebbi, M. Kruszelnicki, H. Czapor-Irzabek, A.K. Urbanek, I. Polowczyk, A. Franzetti, T. Janek, Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* 28E using crude glycerol as a carbon source, *RSC Adv* 13 (2023). <https://doi.org/10.1039/d3ra03408a>.
- [431] P. Bharali, S.P. Singh, N. Dutta, S. Gogoi, L.C. Bora, P. Debnath, B.K. Konwar, Biodiesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous *Pseudomonas aeruginosa*, *RSC Adv* 4 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4ra05594b>.
- [432] S. Joy, P.K.S.M. Rahman, S.K. Khare, S.R. Soni, S. Sharma, Statistical and sequential (fill-and-draw) approach to enhance rhamnolipid production using industrial lignocellulosic hydrolysate C6 stream from *Achromobacter* sp. (PS1), *Bioresour Technol* 288 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121494>.

- [433] N. Panjiar, A.J. Mattam, S. Jose, S. Gandham, H.R. Velankar, Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*, *Science of the Total Environment* 729 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138933>.
- [434] M. Konishi, Y. Yoshida, J. ichi Horiuchi, Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium, *J Biosci Bioeng* 119 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.007>.
- [435] S. Joy, P.K.S.M. Rahman, S.K. Khare, S. Sharma, Production and characterization of glycolipid biosurfactant from *Achromobacter* sp. (PS1) isolate using one-factor-at-a-time (OFAT) approach with feasible utilization of ammonia-soaked lignocellulosic pretreated residues, *Bioprocess Biosyst Eng* 42 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02128-3>.
- [436] K.K.S. Randhawa, P.K.S.M. Rahman, Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market, *Front Microbiol* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
- [437] R. Posada-Baquero, M. Grifoll, J.J. Ortega-Calvo, Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation, *Science of the Total Environment* 668 (2019) 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.056>.
- [438] S. Sun, Y. Wang, T. Zang, J. Wei, H. Wu, C. Wei, G. Qiu, F. Li, A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Bioresour Technol* 281 (2019) 421–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>.
- [439] M. Irfan-Maqsood, M. Seddiq-Shams, Rhamnolipids: Well-Characterized Glycolipids with Potential Broad Applicability as Biosurfactants, *Industrial Biotechnology* 10 (2014). <https://doi.org/10.1089/ind.2014.0003>.
- [440] I.M. Banat, M.A.D. De Rienzo, G.A. Quinn, Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents, *Appl Microbiol Biotechnol* 98 (2014) 9915–9929. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6169-6>.
- [441] T. Meylheuc, C. Methivier, M. Renault, J.M. Herry, C.M. Pradier, M.N. Bellon-Fontaine, Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 52 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.016>.
- [442] D. Sharma, D. Singh, G.M. Sukhbir-Singh, B.M. Karamchandani, G.K. Aseri, I.M. Banat, S.K. Satpute, Biosurfactants: Forthcomings and Regulatory Affairs in Food-Based Industries, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28062823>.

- [443] C. Shen, L. Jiang, H. Shao, C. You, G. Zhang, S. Ding, T. Bian, C. Han, Q. Meng, Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation, *Sci Rep* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37553>.
- [444] C.B.B. Farias, A.F. Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, J.E. Gomes Souza, L.A. Sarubbo, Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent, *Electronic Journal of Biotechnology* 17 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.003>.
- [445] F. Müller, S. Hönzke, W.O. Luthardt, E.L. Wong, M. Unbehauen, J. Bauer, R. Haag, S. Hedtrich, E. Rühl, J. Rademann, Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 116 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.013>.
- [446] C.A. Marangon, V.C.A. Martins, M.H. Ling, C.C. Melo, A.M.G. Plepis, R.L. Meyer, M. Nitschke, Combination of Rhamnolipid and Chitosan in Nanoparticles Boosts Their Antimicrobial Efficacy, *ACS Appl Mater Interfaces* 12 (2020). <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19253>.
- [447] D. Shalini, A. Benson, R. Gomathi, A. John Henry, S. Jerritta, M. Melvin Joe, Isolation, characterization of glycolipid type biosurfactant from endophytic *Acinetobacter* sp. ACMS25 and evaluation of its biocontrol efficiency against *Xanthomonas oryzae*, *Biocatal Agric Biotechnol* 11 (2017) 252–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.013>.
- [448] S. Soltani Dashtbozorg, S. Miao, L.K. Ju, Rhamnolipids as environmentally friendly biopesticide against plant pathogen *Phytophthora sojae*, *Environ Prog Sustain Energy* (2016). <https://doi.org/10.1002/ep.12187>.
- [449] K. V. Deepika, P. Ramu Sridhar, P. V. Bramhachari, Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52, *Biocatal Agric Biotechnol* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.009>.
- [450] S.N. Borah, D. Goswami, H.K. Sarma, S.S. Cameotra, S. Deka, Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize, *Front Microbiol* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01505>.
- [451] I.L. Pepper, C.P. Gerba, *Environmental Microbiology: A Laboratory Manual*, 2004.
- [452] T. Ndlovu, S. Khan, Wesaal. Khan, Distribution and diversity of biosurfactant-producing bacteria in a wastewater treatment plant, *Environmental Science and Pollution Research* 23 (2016) 9993–10004. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6249-5>.
- [453] N.J. Palleroni, Genus *Pseudomonas*, in: N.R. Krieg, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984: pp. 141–199.

- [454] R.Y. Stanier, N.J. Palleroni, M. Doudoroff, The aerobic pseudomonads: a taxonomic study., *J Gen Microbiol* 43 (1966). <https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159>.
- [455] E. Bossis, P. Lemanceau, X. Latour, L. Gardan, The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: Current status and need for revision, *Agronomie* 20 (2000). <https://doi.org/10.1051/agro:2000112>.
- [456] C.N. Mulligan, D.G. Cooper, R.J. Neufeld, Selection of Microbes Producing Biosurfactants in Media without Hydrocarbons, *Journal of Fermentation Technology* 62 (1984) 311–4. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002672851/en/%5Cnhttp://ci.nii.ac.jp/naid/110002672851/>.
- [457] I. Siegmund, F. Wagner, New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar, *Biotechnology Techniques* 5 (1991) 265–268. <https://doi.org/10.1007/BF02438660>.
- [458] D.K. Jain, D.L. Collins-Thompson, H. Lee, J.T. Trevors, A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *J Microbiol Methods* 13 (1991). [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-W](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W).
- [459] N. Shah, R. Nikam, S. Gaikwad, V. Sapre, J. Kaur, Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications, *Indian Journal of Microbiology Research* 3 (2016) 5. <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>.
- [460] M. Morikawa, Y. Hirata, T. Imanaka, A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* (2000). [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4).
- [461] V. Walter, C. Syldatk, R. Hausmann, Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms, in: *Adv Exp Med Biol*, 2010: pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1.
- [462] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-Active Agents from Two Bacillus Species, *Appl Environ Microbiol* 53 (1987) 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>.
- [463] J.E. Zajic, W. Seffens, C. Panchal, Biosurfactants, *Crit Rev Biotechnol* 1 (1983) 87–107. <https://doi.org/10.3109/07388558309082580>.
- [464] A.S. Abu-ruwaida, I.M. Banat, S. Haditirto, A. Salem, M. Kadri, Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria Product Characterization, and Evaluation, *Act& Biotechnologica* 11 (1991) 315–324.
- [465] F. Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, J.C. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe, M. Smith, Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ x174 DNA, *Nature* 265 (1977) 687–695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>.
- [466] K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Mol Biol Evol* 38 (2021) 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

- [467] M.I. Sriram, K. Kalishwaralal, V. Deepak, R. Gracerosept, K. Srisakthi, S. Gurunathan, Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1, *Colloids Surf B Biointerfaces* 85 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.026>.
- [468] O. Pornsunthorntawe, N. Arttaweeporn, S. Paisanjit, P. Somboonthanate, M. Abe, R. Rujiravanit, S. Chavadej, Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery, *Biochem Eng J* 42 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.016>.
- [469] F.Z. Mesbaiah, K. Eddouaouda, A. Badis, A. Chebbi, D. Hentati, S. Sayadi, M. Chamkha, Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions, *Environmental Science and Pollution Research* 23 (2016) 14221–14230. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6526-3>.
- [470] M. Elshikh, S. Ahmed, S. Funston, P. Dunlop, M. McGaw, R. Marchant, I.M. Banat, Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants, *Biotechnol Lett* 38 (2016) 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>.
- [471] S.J. Varjani, D.P. Rana, A.K. Jain, S. Bateja, V.N. Upasani, Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India, *Int Biodeterior Biodegradation* 103 (2015) 116–124. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.03.030>.
- [472] V.I. Brown, E.J. Lowbury, Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*., *J Clin Pathol* 18 (1965) 752–756. <https://doi.org/10.1136/jcp.18.6.752>.
- [473] R. Kumar, A.J. Das, Extraction, Detection, and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactants from Microorganisms, in: *Rhamnolipid Biosurfactant: Recent Trends in Production and Application*, Springer Singapore, Singapore, 2018: pp. 15–28. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1289-2_2.
- [474] Dorra Hentati, Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie, 2020.
- [475] S. Patil, J. Paradeshi, B. Chaudhari, Suppression of charcoal rot in soybean by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* GS-33 under saline conditions, *J Basic Microbiol* 56 (2016). <https://doi.org/10.1002/jobm.201600008>.
- [476] S. Pailan, P. Saha, Chemotaxis and degradation of organophosphate compound by a novel moderately thermo-halo tolerant *Pseudomonas* sp. strain BUR11: Evidence for possible

- existence of two pathways for degradation, PeerJ 2015 (2015).
<https://doi.org/10.7717/peerj.1378>.
- [477] M.B. Miller, P.H. Gilligan, Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis, J Clin Microbiol 41 (2003).
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4009-4015.2003>.
- [478] J.A. and L.T. Garrity George M. and Bell, Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL, in: N.R. and S.J.T. and G.G.M. and B.D.R. and D.V.P. and G.M. and R.F.A. and S.K.-H. Brenner Don J. and Krieg (Ed.), Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, Springer US, Boston, MA, 2005: pp. 323–442. https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_9.
- [479] Y.P. Xiao, W. Hui, Q. Wang, S.W. Roh, X.Q. Shi, J.H. Shi, Z.X. Quan, *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor, Int J Syst Evol Microbiol 59 (2009).
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.005108-0>.
- [480] R.R. Colwell, Proposal of a neotype, ATCC 14216, for *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 and request for an opinion, International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy 15 (1965). <https://doi.org/10.1099/00207713-15-2-87>.
- [481] CLSI, CLSI M100-ED33: 2023 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition, 2023.
- [482] Z. Pang, R. Raudonis, B.R. Glick, T.J. Lin, Z. Cheng, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies, Biotechnol Adv 37 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.
- [483] K.A. Mielko, S.J. Jabłoński, J. Milczewska, D. Sands, M. Łukaszewicz, P. Młynarz, Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*, World J Microbiol Biotechnol 35 (2019).
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>.
- [484] A.K. Satyaprakash, P. Ravanfar, S.K. Tying, Skin and soft-tissue infections, in: Antibiotic and Chemotherapy, Elsevier, 2010: pp. 617–632. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00049-X>.
- [485] D.M. Livermore, Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?, Clinical Infectious Diseases 34 (2002).
<https://doi.org/10.1086/338782>.
- [486] P.D. Lister, D.J. Wolter, N.D. Hanson, Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms, Clin Microbiol Rev 22 (2009). <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.

- [487] C. van Delden, *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: how should we treat them?, *Int J Antimicrob Agents* 30 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.06.015>.
- [488] E.B.M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance, *Trends Microbiol* 19 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- [489] R.E.W. Hancock, D.P. Speert, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment, *Drug Resistance Updates* 3 (2000). <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>.
- [490] E. Drenkard, Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Microbes Infect* 5 (2003). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>.
- [491] W.M.H. Al-Qashbari, M.A.A. Al-Baghdadi, Prevalence and Antibigram Patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Two Wastewater Treatment Plants in Aden Governorate-Yemen, *Yemeni Journal for Medical Sciences* 17 (2024). <https://doi.org/10.20428/yjms.v17i1.2320>.
- [492] N. Roulová, P. Mot'ková, I. Brožková, M. Pejchalová, Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic, *J Water Health* 20 (2022). <https://doi.org/10.2166/wh.2022.101>.
- [493] M.A.S. Khan, Z. Islam, S.T. Shah, S.R. Rahman, Characterization of biofilm formation and multi-drug resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in Dhaka, Bangladesh, *J Water Health* (2024). <https://doi.org/10.2166/wh.2024.294>.
- [494] J.U. Okafor, U.U. Nwodo, Antibigram Profile and Detection of Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Hospital Wastewater Effluent, *Antibiotics* 12 (2023). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101517>.
- [495] D. Hentati, Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie, UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER, 2018.
- [496] A. Nayariseri, P. Singh, S.K. Singh, Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03, *Bioinformation* 14 (2018) 304–314. <https://doi.org/10.6026/97320630014304>.
- [497] E. Déziel, Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, Mémoire, Université du Québec, 1996.
- [498] B.M. El-amine, Isolement, caractérisation et exploitation des métabolites microbiens en bioremédiation de l' environnement, (2017).

- [499] A. Meliani, A. Bensoltane, The Ability of Some *Pseudomonas* Strains to Produce Biosurfactant, Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences 2 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.4172/2375-446x.1000112>.
- [500] B. Zenati, A. Chebbi, A. Badis, K. Eddouaouda, H. Boutoumi, M. El Hattab, D. Hentati, M. Chelbi, S. Sayadi, M. Chamkha, A. Franzetti, A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement, Ecotoxicol Environ Saf 154 (2018) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.032>.
- [501] F.Z. Ferradji, S. Mnif, A. Badis, S. Rebbani, D. Fodil, K. Eddouaouda, S. Sayadi, Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria), Int Biodeterior Biodegradation 86 (2014) 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.003>.
- [502] M.E. Djoued, Caractérisation des différentes aptitudes des souches de la flore tellurique et marine du genre *Rhodococcus* isolées de sites contaminés., Mémoire de Magister, Université Oran 1 Ahmed Ben Bella, 2013.
- [503] S. Sharma, P. Datta, B. Kumar, P. Tiwari, L.M. Pandey, Production of novel rhamnolipids via biodegradation of waste cooking oil using *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7815, Biodegradation 30 (2019) 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09874-x>.
- [504] D. Sharma, Classification and Properties of Biosurfactants, in: Biosurfactants in Food, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 21–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39415-2_2.
- [505] R. de C.F. Soares da Silva, D.G. Almeida, H.M. Meira, E.J. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry, Biocatal Agric Biotechnol 12 (2017) 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.004>.
- [506] H. Çakmak, G. Güngörmedi, G. Dikmen, P.A. Çelik, A. Çabuk, The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affect rhamnolipid characteristics, European Journal of Lipid Science and Technology 119 (2017) 1700002. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700002>.
- [507] M. Tiwary, A.K. Dubey, Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of *Pseudomonas aeruginosa*, Isolate ADMT1, J Surfactants Deterg 21 (2018) 113–125. <https://doi.org/10.1002/jsde.12021>.
- [508] I.A. Phulpoto, Y. Wang, M.A. Qazi, B. Hu, F. Ndayisenga, Z. Yu, Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading *Pseudomonas* sp. S2WE isolated from freshwater lake, Bioresour Technol 323 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124601>.

- [509] G. Lan, Q. Fan, Y. Liu, C. Chen, G. Li, Y. Liu, X. Yin, Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4, *Biochem Eng J* 101 (2015) 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>.
- [510] G.S. Shreve, R. Makula, Characterization of a new rhamnolipid biosurfactant complex from *Pseudomonas* isolate DYNA270, *Biomolecules* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/biom9120885>.
- [511] Í.W.L. De França, A.P. Lima, J.A.M. Lemos, C.G.F. Lemos, V.M.M. Melo, H.B. De Sant'ana, L.R.B. Gonçalves, Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils, *Catal Today* 255 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>.
- [512] R.B. Lovaglio, F.J. dos Santos, M. Jafelicci, J. Contiero, Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: PH rules, *Colloids Surf B Biointerfaces* 85 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.001>.
- [513] S. Mishra, S.N. Singh, V. Pande, Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition, *Bioresour Technol* 164 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.076>.
- [514] M.S. Rabani, R. Sharma, R. Singh, M.K. Gupta, Characterization and Identification of Naphthalene Degrading Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites and Their Possible Use in Bioremediation, *Polycycl Aromat Compd* (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1080/10406638.2020.1759663>.
- [515] D. Hentati, A. Chebbi, S. Loukil, S. Kchaou, J.-J. Godon, S. Sayadi, M. Chamkha, Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia, *Environmental Science and Pollution Research* 23 (2016) 15088–15100. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6648-7>.
- [516] R. Patowary, K. Patowary, M.C. Kalita, S. Deka, J.M. Borah, S.J. Joshi, M. Zhang, W. Peng, G. Sharma, J. Rinklebe, H. Sarma, Biodegradation of hazardous naphthalene and cleaner production of rhamnolipids — Green approaches of pollution mitigation, *Environ Res* 209 (2022) 112875. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.112875>.
- [517] C. Abdelkrim, Potential for Crude Oil and Diesel Biodegradation by the Indigenous *Pseudomonas* sp. Strain LGMS7 Using GC-MS and GC-FID Analyses, *Jordan J Biol Sci* 15 (2022) 441–448. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150313>.
- [518] B. Muthukumar, M.S. Al Salhi, J. Narenkumar, S. Devanesan, Tentu Nageswara Rao, W. Kim, A. Rajasekar, Characterization of two novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* on biodegradation of crude oil and its enzyme activities, *Environmental Pollution* 304 (2022) 119223. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119223>.

- [519] R. Kumar, A.J. Das, Industrial Applications of Rhamnolipid: An Innovative Green Technology for Industry, in: Rhamnolipid Biosurfactant, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1289-2_6.
- [520] K. Sambanthamoorthy, X. Feng, R. Patel, S. Patel, C. Paranavitana, Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens, BMC Microbiol 14 (2014) 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-197>.
- [521] T.B. Lotfabad, F. Shahcheraghi, F. Shooraj, Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains, Jundishapur J Microbiol (2013). <https://doi.org/10.5812/jjm.2662>.
- [522] D. Sharma, Applications of Biosurfactants in Food, in: Biosurfactants in Food, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 43–80. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39415-2_3.
- [523] F. Widdel, N. Pfennig, Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids, Arch Microbiol (1981). <https://doi.org/10.1007/bf00406470>.
- [524] M.M. Moghaddam, Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*, Clinical Microbiology: Open Access 03 (2014). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000156>.
- [525] A.D. Patiño, M. Montoya-Giraldo, M. Quintero, L.L. López-Parra, L.M. Blandón, J. Gómez-León, Dereplication of antimicrobial biosurfactants from marine bacteria using molecular networking, Sci Rep 11 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95788-9>.
- [526] S. Cerqueira dos Santos, C. Araújo Torquato, D. de Alexandria Santos, A. Orsato, K. Leite, J.M. Serpeloni, R. Losi-Guembarovski, E. Romão Pereira, A.L. Dyna, M.G. Lopes Barboza, M.H. Fernandes Arakawa, J.A. Pires Bitencourt, S. da Cruz Silva, G.C. da Silva Sá, P. Dias Rodrigues, C.M. Quintella, L.C. Faccin-Galhardi, Production and characterization of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Amazon region, and potential antiviral, antitumor, and antimicrobial activity, Sci Rep 14 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54828-w>.
- [527] D. Gulati, M. Ahmad, M. Bhatia, Evaluation of biosurfactant production from *Pseudomonas mendocina* and its antibacterial application, Biocatal Agric Biotechnol 66 (2025) 103609. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2025.103609>.

VII. Annexes

1. Milieux de culture

Tableau 16 : Composition des milieux de culture.

Milieux	Ingrédients	g/L	Références
Bouillon nutritif (BN)	Extrait de viande	1	610037
	Peptone	5	
	Extrait de levure	2	
	Na Cl	5	
Milieu Luria-Bertani (LB)	Extrait de viande	1	610245
	Peptone	10	
	Extrait de levure	5	
	Na Cl	5	
Pseudomonas Agar F	Peptospecial	20	610309
	Sulfate de magnésium	1,5	
	Phosphate di-potassium	1,5	
	Glycerol (Ref. 15523-1L-R)	10 mL	
	Agar	14	
Pseudomonas Agar P	Digestion pancréatique de caséine	20	610310
	Chlorure de magnésium	1,4	
	Sulfate de potassium	10	
	Glycérol (Ref. 15523-1L-R)	10 mL	
	Agar-agar	15	
Gélose au cétrimide	Cétrimide	0,3	610041
	Chlorure de magnésium	1,4	
	Sulfate de potassium	10	
	Un digest pancréatique de	20	
	Glycérol	10 mL	
	Agar	13,6	
Milieu Mueller Hinton (MH)	Extrait de viande	2	610627
	Hydrolysate acide de caséine	17,5	
	Amidon	1,5	
	Agar	17	
Gélose au sang	Tryptose	10	610005
	Na Cl	1,4	
	Extrait de viande	10	
	Agar	15	
	Sang défibriné	50 ml	
TSI agar	Peptospecial	20	610055
	Lactose	10	
	Sucrose	10	
	Chlorure de sodium	5	
	Extrait de viande	3	
	Extrait de levure	3	
	Glucose	1	
	Sulfate de fer	0,2	
	Thiosulfate de sodium	0,3	
	Rouge de phénol	0,025	

	Agar	12	
Gélose au Rouge Congo	Peptone	10	/
	Extrait de levure	1	
	Rouge Congo	0,5	
	Agar	15	
Milieu de bromure de cétyltriméthyl ammonium (CTAB)	Glucose	20	/
	KH ₂ PO ₄	0,95	
	K ₂ HPO ₄	2,27	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,67	
	Solution de trace élémentaire composée de :	2 mL	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2	
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,5	
	CTAB	0,2	
	Bleu de méthylène	0,005	
	Agar	20	
Milieu Bushnell and Haas (BH)	K ₂ HPO ₄	1	/
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02	
	KH ₂ PO ₄	1	
	FeCl ₃	0,05	
	NH ₄ NO ₃	1	
Milieu de base (MB)	K ₂ HPO ₄	0,5	/
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05	
	KH ₂ PO ₄	0,5	
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,33	
	NH ₄ Cl	1	
	Na Cl	5	
	Solution d'oligo-éléments selon Widdel et Pfennig [523], composée de :	1 mL	
	FeCl ₂ .4H ₂ O	1,5	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,19	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1	
	ZnCl ₂	0,07	
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,036	
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024	
H ₃ BO ₃	0,006		

2. Séquence du gène codant pour l'ARNr 16S des souches isolées

- **Souche BSP4 (1166 pb)**

TACCATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA
ATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAAGTGGG
GGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGG
CGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAAT
AAGCACCGGCTAACCTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCGGTAGGTGGTTACAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAC
CTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCGATAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCA
GAGATGGATTGGTCCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCTGGGCCCTACGGCAGGGGT

- **Souche BSP6 (1169 pb)**

CATGACAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAT
CTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAAGTGGGGG
ATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCG
ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT
TGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAG
CACCGGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
CGCGCGGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTG
AGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCG
GATAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCAGAG
ATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGG
TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCTAGGCCCTTACGGCCAGGGTACC

- **Souche BSP9 (1058 pb)**

ACCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAAGT
GGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCA
AGGCGAGCATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGACAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCT
TCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAG
AATAAGCACCGGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTACGAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAA
CTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATT
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCT
AACCGGATAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCA

- **Souche BSP12 (1132 pb)**

ATCATTTCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCT
AATACCGCATAACGTCTGAGGGAGAAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGGAT
TAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTG
GAAGTGCAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
CAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTA
ATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTACGAAGTTGGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG
GTGGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTGACGCTAGCCGT

GGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTT
ACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCAT
GGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCCTTAGTTACCAG
CACCTCGGGTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACCCC

- **Souche BSP13 (1165 pb)**

CGCAATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA
ATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGGCGTAATACCGCATACTGCCTGAGGGAGAAAAGTGGG
GGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGG
CGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGTCTTCG
GATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAAT
AAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCGCTAGGTGGTTACGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAATA
CTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAA
CGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCA
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGG

3. Galerie API 20 NE

REF 20 050

07615K - fr - 2009/11



IVD

Système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API 20 NE
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API AUX Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API 20 NE est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API AUX	Sulfate d'ammonium	2 g
Medium	Agar	1,5 g
7 ml	Solution de vitamines	10,5 ml
	Solution d'oligo-éléments	10 ml
	Phosphate monosodique	6,24 g
	Chlorure de potassium	1,5 g
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH final : 7,0-7,2	

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs

- API NaCl 0,85 % Medium, 2 ml (Réf. 20 070)
- Réactifs : JAMES (Réf. 70 542)
- NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635*)
- * référence non commercialisée dans certains pays : utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) point 0,5
- Catalogue Analytique API 20 NE (Réf. 20 090) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel

- Pipettes ou PSlpettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

• Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.

• Pour usage professionnel uniquement.

Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).

Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption. Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.

Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, ...

Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :

- Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
- Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
- Bien enfoncer le bouchon.
- Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
- Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
- Enlever délicatement le bouchon.



Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté (ex. gélose Trypase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE**Test Oxydase**

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21^{ème} test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Sélection des colonies

API 20 NE doit être utilisé avec des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux.

NOTE 1 : certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter...*) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

NOTE 2 : Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 NE. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0,85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSlpette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSlpette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

LECTURE ET INTERPRETATION**Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.
- **Test NO₃ :**
 - Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une couleur **rouge** indique une réaction **positive**, à noter sur la fiche de résultats.
 - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une cupule restée **incolor** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule devient **rose-rouge**, la réaction est **négative** car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

- **Test TRP :** Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive**.

• Tests d'assimilation :

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction **positive**.

Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées \mp ou \pm .

Une fois cette lecture effectuée, l'identification doit être pratiquée comme indiqué au paragraphe "Interprétation".

Une réincubation est nécessaire dans les cas suivants :

- faible discrimination ;
- profil inacceptable ou profil douteux ;
- si la note suivante est indiquée pour le profil obtenu :

IDENTIFICATION NON VALIDE
AVANT 48 H D'INCUBATION

Alors, éliminer, à l'aide d'une pipette ou d'une PSlpette, les réactifs NIT 1, NIT 2 et JAMES par aspiration, recouvrir immédiatement les tests NO₃ et TRP d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe, incuber à nouveau à 29°C ± 2°C puis lire 24 h plus tard, sauf les trois premiers tests : NO₃, TRP, GLU qui doivent être lus uniquement à 24 h.

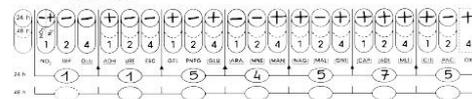
Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique :
Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^e test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

- Identification :
Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)

- * à l'aide du Catalogue Analytique :
 - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
- * à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :
 - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.



1 154 575 *Pseudomonas aeruginosa*

CONTROLE DE QUALITE

Les galeries et milieux font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication.

Le **Contrôle de Qualité Minimum** peut être utilisé pour vérifier que les conditions de stockage et de transports n'ont pas d'impact sur les performances de la galerie API 20 NE. Ce contrôle peut être réalisé en suivant les instructions et critères attendues ci-dessus en lien avec le référentiel CLSI M50-A Quality Control for Commercial Microbial identification Systems.

Comme aucun substrat de la galerie n'est sensible aux conditions de stockage et de transports, le Contrôle de Qualité Minimum peut être réalisé en testant deux souches : *Aeromonas hydrophila* ATCC® 35654 qui présente des tests principalement positifs et *Alcaligenes faecalis* ATCC 35655, qui présente des tests principalement négatifs avec API 20 NE.

Dans le cas où un **contrôle de Qualité Complet** est exigé pour cette galerie, les quatre souches suivantes devront être testées pour vérifier les réactions positives et négatives de la plupart des tests de la galerie API 20 NE.

- | | | | |
|--------------------------------|------------|---------------------------------------|------------|
| 1. <i>Aeromonas hydrophila</i> | ATCC 35654 | 3. <i>Sphingobacterium multivorum</i> | ATCC 35656 |
| 2. <i>Alcaligenes faecalis</i> | ATCC 35655 | 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	LARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	LADJ	MLT	CIT	PAC	OX
1.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-*	-	+
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
3.	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4.	+	-	-	V	V	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

* Des réactions faiblement positives peuvent être observées.

Profil obtenu à partir de colonies cultivées sur gélose Trypcase Soja et après 48 heures d'incubation pour les tests ADH à PAC.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API 20 NE est destiné à l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux présents dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice) et à eux seuls. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres micro-organismes ou exclure leur présence.
- Les bacilles à Gram négatif non fermentants, isolés de patients atteints de mucoviscidose, peuvent générer des profils biochimiques atypiques susceptibles d'altérer leur identification.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

5728 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 92,53 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 3,13 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 4,34 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Les ampoules d'API AUX Medium non utilisées peuvent être éliminées comme déchets non dangereux.

Éliminer tous les réactifs utilisés ou non utilisés (autre que les ampoules d'API AUX Medium) ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				Zn / 5 min	
				rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β -D- galactopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β - Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale notamment peptone bovine/porcine.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. III
TABLES DES SYMBOLES	p. IV

bioMérieux, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.
ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

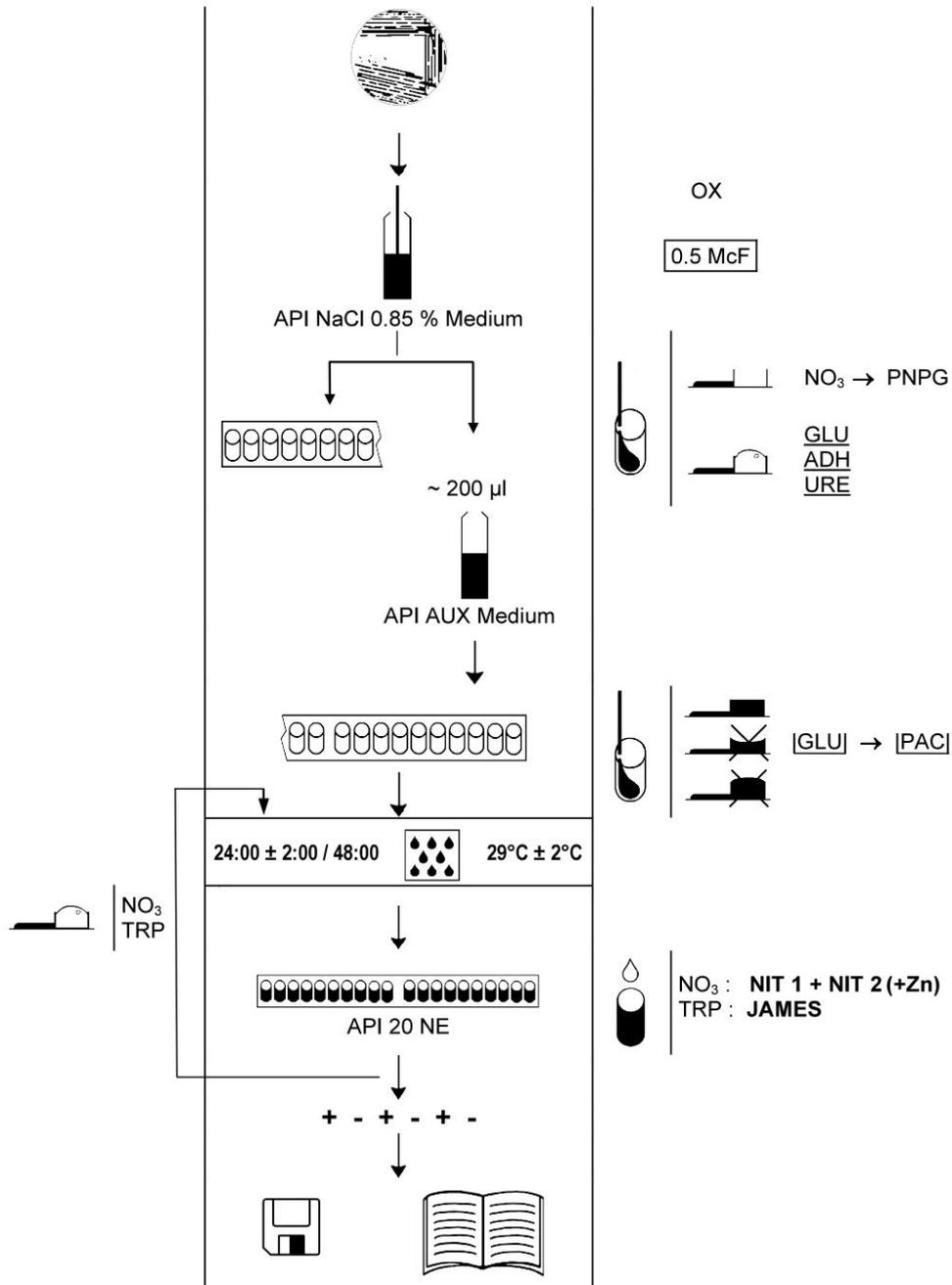


bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Étoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
Imprimé en France



METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODE / METODYKA



**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /
 TABELA IDENTYFIKACJI**

% de réactions positives après 24-48 h à 29°C ± 2°C / % of positive reactions after 24-48 hrs. at 29°C ± 2°C /
 % der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 24-48 H a 29°C ± 2°C /
 % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 29°C ± 2°C / % de reacções positivas após 24-48 H a 29°C ± 2°C /
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 24-48 ώρες στους 29°C ± 2°C / % av positiva reaktioner efter 24-48 timmar vid 29°C ± 2°C /
 % af positive reaktioner efter 24-48 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 24-48 godzinach w 29°C ± 2°C

API 20 NE	V7.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	GTa	PACa	OX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	0	2	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Comamonas testosteroni/Ps. alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Delftia acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Grimontia hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica / Pasteurella trehalosi</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	0	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damselae</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas oryzae/habitans</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylglyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Rhizobium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100
<i>Wautersia paucula</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98

Vérifier la mobilité / Check the motility / Beweglichkeit überprüfen / Verificar la movilidad / Verificare la mobilità /

Verificar a mobilidade / Ελέγξει την κινητικότητα / Kontrollera motiliteten / Kontrollér motiliteten / Sprawdzić zdolność do ruchu:

Mobilité / Motility / Beweglichkeit / Movilidad / Mobilità / Mobilidade / Κινητικότητα / Motilitet / Ruch	<i>Brevundimonas diminuta / vesicularis</i>	<i>Moraxella spp</i>
	+	-

**BIBLIOGRAPHIE / LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA /
ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΩΝ / REFERENSLITTERATUR / LITTERATURHENVISNINGER /
PISMIENICTWO**

1. APPELBAUM P.C., LEATHERS D.J.
Evaluation of the Rapid NFT System for Identification of Gram-Negative, Nonfermenting Rods.
(1984) J. Clin. Microbiol. 20, 730-734.
2. BERNARDS A.T., VAN DER TOORN J., VAN BOVEN C.P.A., DIJKSHOORN L.
Evaluation of the Ability of a Commercial System to Identify *Acinetobacter* Genomic Species.
(1996) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 4, 303-308.
3. BILKEY M.K., BREMNER D.A., CAMERON G.L., GARNER J.G.
Comparison of Five Commercial Methods for the Identification of Non-fermentative and Oxidase Positive Fermentative Gram-Negative Bacilli.
(1988) N.Z.J. Med. Lab. Technol., 8-12.
4. CULLEN K.C., KLOOSTERMAN R.E., SHALIS P.J., PIERSON C.L.
Comparison of Three Commercial Systems for the Identification of Glucose Non-fermenting Gram-Negative Rods.
(1989) ASM Annual Meeting - Poster N° C26.
5. DANCE D.A.B., WUTHIEKANUN V., NAIGOWIT P., WHITE N.J.
Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in Clinical Practice : Use of Simple Screening Tests and API 20 NE.
(1989) J. Clin. Pathol. 42, 645-648.
6. FRENEY J., GARONNAT D., BOUVARD V., FLEURETTE J.
Comparaison de Deux Systèmes d'Identification de Bacilles Gram Négatifs Non Fermentants et de Bacilles Fermentants Oxydase Positive.
(1984) Ann. Biol. Clin. 42, 337-341.
7. GEISS H.K., PIOTROWSKI H.D., HINGST V.
Evaluation of API 20 NE in Routine Diagnostics of Nonfermenting Gram-Negative Rod-Shaped Bacteria.
(1985) Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A-Med. 259, 1, 35-42.
8. KISKA D.L., KERR A., JONES M.C., CARACCILO J.A., ESKRIDGE B., JORDAN M., MILLER S., HUGHES D., KING N., GILLIGAN P.H.
Accuracy of Four Commercial Systems for Identification of *Burkholderia cepacia* and Other Gram-Negative Nonfermenting Bacilli recovered from Patients with Cystic Fibrosis.
(1996) J. Clin. Microbiol. 34, 4, 886-891.
9. LAMPE A.S., VAN DER REIJDEN T.J.K.
Evaluation of Commercial Test Systems for the Identification of Nonfermenters.
(1984) Eur. J. Clin. Microbiol. 3, 301-305.
10. MARTIN R., SIAVOSHI F., McDOUGAL D.L.
Comparison of Rapid NFT System and Conventional Methods for Identification of Nonsaccharolytic Gram-Negative Bacteria.
(1986) J. Clin. Microbiol. 24, 1089-1092.
11. OVERMAN T.L., KESSLER J.F., SEABOLT J.P.
Comparison of API 20 E, API Rapid E and API Rapid NFT for Identification of Members of the Family *Vibrionaceae*.
(1985) J. Clin. Microbiol. 22, 778-781.
12. PALMIERI M.J., CARITO S.L., MEYER R.F.
Comparison of Rapid NFT and API 20 E with Conventional Methods for Identification of Gram-Negative Nonfermentative Bacilli from Pharmaceuticals and Cosmetics.
(1988) Applied and Environmental Microbiol. 54, 2838-2841.
13. PELADAN F., MONTEIL H.
Identification of *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Alcaligenes* with the API 20 NE System.
(1988) Path. Biol., 36, 187-192.
14. SOGAARD P., GAHRN-HANSEN B., HUI-PING Z., FREDERIKSEN W.
An Investigation of Three Commercial Methods for Rapid Identification of Non-Enteric Gram-Negative Rods.
(1986) Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 94, 357-363.
15. TOWNER K.J., CHOPADE B.A.
Biotyping of *Acinetobacter calcoaceticus* using the API 20 NE System.
(1987) Journal of Hospital Infection. 10, 145-151.
16. VON GRAEVENITZ A., ZOLLINGER-ITEN J.
Evaluation of Pertinent Parameters of a New Identification System for Non-Enteric Gram-Negative Rods.
(1985) Eur. J. Clin. Microbiol. 4, 108-112.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute, M50-A Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems; Approved Guideline, Vol. 28 n° 23.

TABLE DES SYMBOLES / INDEX OF SYMBOLS / SIMBOLE / CUADRO DE SIMBOLOS /
TABELLA DEI SIMBOLI / QUADRO DOS SÍMBOLOS / ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ / SYMBOLER /
SYMBOLFORTEGNELSE / TABELA SYMBOLI

Symbole / Symbol Símbolo / Simbolo Σύμβολο	Signification / Meaning / Bedeutung Significado / Significato / Επεξήγηση Betydelse / Betydning / Znaczenie
 REF	Référence du catalogue Catalogue number (GB) / Catalog number (US) Bestellnummer / Número de catálogo / Numero di catalogo Referência de catálogo / Αριθμός καταλόγου Katalognummer / Katalognummer / Numer katalogowy
 IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivo médico para diagnóstico in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik Wyrób do diagnostyki In Vitro
	Fabricant / Manufacturer / Hersteller / Fabricante Fabbicante / Κατασκευαστής / Tillverkare / Producent
	Limites de température / Temperature limitation Temperaturbegrenzung / Limite de temperatura Limiti di temperatura / Limites de temperatura Περιορισμοί θερμοκρασίας / Temperaturbegränsning Temperaturbegrænsning Przestrzegać zakresu temperatury
	Utiliser jusque / Use by / Verwendbar bis Fecha de caducidad / Utilizzare entro / Prazo de validade Ημερομηνία λήξης / Använd före / Holdbar til / Użyć przed
 LOT	Code du lot / Batch code Chargenbezeichnung / Código de lote Codice del lotto / Código do lote Αριθμός Παρτίδας / Lot nummer / Lotnummer / Kod partii
	Consulter les instructions d'utilisation Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Consulte as instruções de utilização Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Se handhavandebeskrivningen / Se brugsanvisning Sprawdź w instrukcji obsługi
	Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi Conteúdo suficiente para "n" ensaios Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Räcker till "n" antal tester Indeholder tilstrækkeligt til "n" test Wystarczy na wykonanie <n> testów



 **bioMérieux SA**
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Étoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
Imprimé en / Printed in France

