



# MICROCIRCLE

**STUDIUL AL LITERATURII DE  
SPECIALITATE RELEVANTE PRIVIND  
CONVERSIA MICROBIANĂ A UNOR  
SURSE DE CARBON ÎN  
BIOSURFACTANȚI**

# STUDIUL AL LITERATURII DE SPECIALITATE RELEVANTE PRIVIND CONVERSIA MICROBIANĂ A UNOR SURSE DE CARBON ÎN BIOSURFACTANȚI

Institutul pentru Cercetări în Economie Circulară și Mediu „Ernest Lupan”- IRCEM



## Colectiv de elaborare:

Dr.ing. Lucian Ionel Cioca

Drd. Andrea Szilagyı

Dr. ing. ec. Elena-Simina Lakatos

Drd. ing. Geanina-Maria David

Drd. ing. Roxana-Maria Druța

## Editor

Voichita Clinci

Proiect finanțat prin Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării, CCCDI - UEFISCDI, numărul de proiect PN-III-P2-2.1-PED-2021-3528, în cadrul PNCDI III”.

## Data

Noiembrie, 2022

Cluj-Napoca

DOI: 10.5281/zenodo.7378623

## Disclaimer

Opiniile exprimate în acest studiu sunt exclusiv ale autorilor și nu pot fi considerate poziția oficială a Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării, CCCDI - UEFISCDI.



This work was supported by a grant of the Ministry of Research, Innovation and Digitization, CCCDI - UEFISCDI, project number PN-III-P2-2.1-PED-2021-3528, within PNCDI III”

# CUPRINS

---

CAPITOLUL 1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE PRIVIND BIOSURFACTANȚII.....	4
1.1 Explicarea contextului .....	4
1.2 Definierea biosurfactanților .....	5
1.3 Caracterizarea fizico-chimică a biosurfactanților.....	6
1.4 Caracteristici și aplicabilitate .....	8
1.5 Dovezi empirice anterioare privind conversia microbiană a surselor de carbon în biosurfactanți.....	10
CAPITOLUL 2: PRODUCȚIA DE BIOSURFACTANȚI PE BAZA TULPINII MICROBIENE BACILLUS .....	12
2.1 Speciile Bacillus și rolul lor în mediu.....	12
2.2 Ecologia sporilor de Bacillus în sol și roci .....	13
2.3 Exploatarea sporilor de către om .....	14
2.3.1 Sporii ca biosimetre .....	14
2.3.2 Sporii ca agenți de control biologic .....	15
2.4 Evoluții în utilizarea speciilor de Bacillus pentru producția industrială.....	16
2.4.1 Producția industrială de enzime .....	16
CAPITOLUL 3: PRODUCȚIA DE BIOSURFACTANȚI PE BAZA TULPINII MICROBIENE PSEUDOMONAS.....	19
2.1 Descrierea genului Pseudomonas .....	19
2.2 Tulpinile de Pseudomonas prezente în sol.....	20
2.3 Rolul pseudomonas în degradarea clorpirifosului .....	20
CAPITOLUL 4. CONCLUZII ȘI DISCUȚII.....	24
BIBLIOGRAFIE.....	26

# INTRODUCERE

Biosurfactanții sunt deosebit de importanți în contextul eforturilor globale îndreptate către sustenabilitate prin faptul că, din punct de vedere ecologic, sunt non-toxici, biodegradabili și prezintă o eficiență mai mare într-o varietate de condiții extreme, cum ar fi temperatura, pH-ul, salinitatea, și prezintă acceptabilitate pentru mediu în comparație cu agenții tensioactivi chimici. Cu toate acestea, creșterea volumului producției sustenabile de biosurfactanți necesită un proces economic integrat care include reducerea deșeurilor, reutilizarea și reciclarea. Economia circulară ar putea fi o opțiune viabilă, deoarece ar permite dezvoltarea unei noi economii orientate spre tehnologie, cu un potențial ridicat de ocupare a forței de muncă și un impact redus asupra mediului. În ciuda potențialului substanțial pe care biosurfactanții îl au în procesul de tranziție către o economie circulară (de exemplu, utilizarea deșeurilor ca materie primă pentru a genera biosurfactantul, recuperarea petrolului, bioremedierea etc.), implicarea lor în acest subiect este în prezent insuficient cercetată în literatura de specialitate. Proiectul **MICROCIRCLE**, derulat de Institutul pentru cercetări în Economie Circulară și Mediu Ernest Lupan (Coordonator) și Institutul National de Cercetare-Dezvoltare Chimico - Farmaceutică - I.C.C.F. Bucuresti (Partener) își propune să răspundă acestei provocări, prin aducerea de contribuții științifice teoretice și practice la conversia microbiană a unor deșeuri alimentare și petroliere în biosurfactanți.

Studiul de față face parte din etapa 1 (Evaluarea producției de biosurfactanți pentru tulpini microbiene din genurile *Bacillus* și *Pseudomonas*) și are scopul de a prezenta o sinteză a literaturii de specialitate privind conversia microbiană a unor surse de carbon în biosurfactanți.

Astfel, în cadrul primului capitol se prezintă noțiuni despre procesul de producție a biosurfactanților, compuși chimici prezenți într-o gamă variată a produselor de uz zilnic. În capitolul doi se prezintă genurile microbiene *Bacillus*, care sunt utilizate în numeroase aplicații medicale, farmaceutice, agricole și industriale. Al treilea capitol introduce terminologia privind genurile microbiene *Pseudomonas*. Acest gen microbian beneficiază de o varietate de organisme bacteriene care îl compun, ele fiind omniprezente în natură, dezvoltându-se în nișe ecologice foarte diferite, inclusiv în soluri, apă și aer. Ultimul capitol prezintă un set de concluzii, dar și câteva direcții viitoare privind producția de biosurfactanți din genurile microbiene *Bacillus* și *Pseudomonas*.

# CAPITOLUL 1. NOȚIUNI FUNDAMENTALE PRIVIND BIOSURFACTANȚII

---

## 1.1 EXPLICITAREA CONTEXTULUI

O gamă variată a produselor de uz zilnic, cum ar fi alimentele, băuturile, produsele cosmetice, medicamente și detergenți, au în compoziția lor o clasă de compuși chimici numiți agenți tensioactivi. Calitatea vieții și starea de sănătate a umanității sunt asociate cu disponibilitatea și utilizarea în condiții de siguranță a acestor compuși, ceea ce face ca agenții tensioactivi să fie extrem de importanți pentru societate (Karsa & Houston, 2006).

Originea cuvântului surfactant derivează din combinația termenilor "agent activ de suprafață", iar utilizarea sa este utilizată pentru a desemna compușii organici ale căror molecule prezintă simultan două tipuri de segmente: polare, care corespund unei structuri hidrofile (lipofobe sau oleofob), și nepolare, constând într-un cap hidrofob (lipofilă sau oleofilă). Moleculele cu acest tip de structură sunt desemnate ca fiind amfifile sau amfifatice. În acest sens, porțiunea hidrofilă permite agentului tensioactiv să fie solubil în solvenți polari, în timp ce porțiunea hidrofobă permite solubilitatea în solvenți nepolari și uleiuri (Farn, 2008).

Dimensiunile și formele segmentelor hidrofile și hidrofobe ale agenților tensioactivi sunt responsabile pentru mai multe dintre proprietățile acestora și mulți dintre acești agenți nu prezintă doar o singură proprietate, ci o combinație a acestora. Unele dintre aceste proprietăți sunt reprezentate de reducerea tensiunilor superficiale și interfaciale, a umezelii, a dispersiei și a agregării solidelor, acțiunea de spumare și dezumidificare, emulsificare și demulsificare, detergență și interacțiuni sinergice cu alți agenți tensioactivi (Farn, 2008).

Proprietățile prezentate de agenții tensioactivi sunt legate în mod intrinsec de aplicațiile lor, care sunt destul de diverse și pot fi utilizate în aproape toate sectoarele industriale, cum ar fi construcții civile, industria alimentară, industria petrolieră, industria pielăriei, industria textilă, industria hârtiei și a rășinilor. Astfel, acești agenți pot contribui la crearea de produse, inclusiv detergenți, coloranți, produse cosmetice, medicamente, fibre, materiale plastice, vopsele și produse agrochimice (Tadros, 2013; Farn, 2008).

Producția de agenți tensioactivi sintetici datează încă din prima jumătate a secolului al XX-lea, dar cu toate acestea, ea a prezentat o creștere mai semnificativă abia după cel de-al Doilea Război Mondial, odată cu debutul industriei petrochimice, care a început să furnizeze materia primă necesară pentru obținerea acestor compuși (Karsa & Houston, 2006). Surfactanții sintetici au atras atenția nu doar datorită gamei lor largi de aplicații și participarea remarcabilă în societate, ci și pentru utilizarea derivaților din petrol ca materie primă și potențial dăunătoare pentru mediu din cauza ecotoxicității, bioacumulării și biodegradabilității scăzute a acestora. Acest scenariu a dus la politici restrictive de utilizare sau în cazuri mai grave la retragerea lor de pe piață (Jiménez-

Peñalver, 2019). Astfel s-a întâmplat cu tensioactivele nonilfenol și nonilfenol etoxilate, a căror utilizare și comercializare au fost restricționate în 2003 în Uniunea Europeană din cauza riscului pe care îl prezintă pentru mediului (European Union, 2003).

Literatura de specialitate evidențiază ideea că agenții tensioactivi sintetici ar putea efecte potențial dăunătoare atunci când sunt utilizate în formularea medicamentelor (Bujak, Wasilewski & Nizioł-Łukaszewska, 2015). Această situație a impulsionat ideea căutării unor noi compuși care pot înlocui surfactanții sintetici în multiplele aplicații ale acestora, păstrând în același timp caracteristicile de surfactant pentru a proteja natura și sănătatea umană.

O alternativă favorabilă pentru aceste situații sunt biosurfactanții. Biosurfactanții sunt molecule amfifile de origine biologică, deoarece sunt sintetizate de organisme vii (Jahan, 2020). Biosurfactanții sunt molecule produse în mod natural care demonstrează proprietăți potențial utile, cum ar fi capacitatea de a reduce tensiunile de suprafață între diferite faze. Pe lângă faptul că au proprietăți similare cu cele chimice artificiale ale acestora omologii chimici, sunt considerați ecologici, biodegradabili și mai puțin toxici, ceea ce îi face dezirabili (Elshikh, Marchant & Banat, 2016).

Spre deosebire de surfactanții sintetici, biosurfactanții au un impact scăzut asupra mediului și pot fi produși din materii prime regenerabile. Pe lângă faptul că prezintă o serie de proprietăți atractive, cum ar fi o biodegradabilitate mai mare, o toxicitate scăzută și o stabilitate mai bună pentru a acționa în condiții extreme de temperatură, pH și salinitate, își mențin aplicabilitatea în mai multe domenii industriale. Astfel, biosurfactanții au multe beneficii și domenii de aplicabilitate, lucru care îi face să fie o alternativă promițătoare la cei sintetici. Cu toate acestea, ei se confruntă cu unele bariere legate de costurile de producție ridicate asociate cu materii prime scumpe, dificultăți de optimizare, randamente scăzute și purificare inefficientă.

Pentru a se obține un rol mai competitiv pentru biosurfactanți în piață curentă, este necesar să se îmbunătățească condițiile de producție la scară și să se exploreze noi aplicații pentru biosurfactanți sustenabili din punct de vedere ecologic și mai puțin dăunători care pot contribui în mod pozitiv la reducerea dependenței de tensioactivi sintetici (Marchant & Banat, 2012).

## 1.2 DEFINIREA BIOSURFACTANȚILOR

Agenții tensioactivi naturali, verzi sau regenerabili -biosurfactanți- sunt termenii utilizați pentru a descrie diversitatea agenților tensioactivi amfifili, molecule amfifile sintetizate de plante, animale, chiar și de oameni, și microorganisme, care împreună însumează aproximativ 2000 de substanțe amfifile diferite, de origine biologică, prezentate în literatura de specialitate (Marchant & Banat, 2012).

Cu toate că producerea lor se realizează la nivelul mai multor organisme vii, obținerea biosurfactanților prin microorganisme este facilitată de timpul redus de producție care rezultă dintr-un ciclu de creștere mai scurt în comparație cu cel prezent la plante și animale, ceea ce face

ca agenții tensioactivi microbieni să fie una dintre principalele alternative pentru posibile explorări comerciale (Lang, 2002; Marchant & Banat, 2012). Primele rapoarte privind utilizarea biosurfactanților sunt prezente încă din 1949 și 1968, începând cu identificarea unei bacterii biosurfactant care avea activitate antibiotică și hemolitică, iar mai târziu, prin identificarea unui biosurfactant bacterian capabil să acționeze ca un inhibitor puternic al coagulării (Jarvis & Johnson, 1949; Arima, Kakinuma & Tamura, 1968).

Biosurfactanții produși de microorganisme rămân integrați în membrana celulară sau sunt secretați în mediul de cultură. Ei sunt compuși de mare relevanță fiziologică pentru microorganisme, îndeplinind diverse funcții, cum ar fi motilitatea, interacțiunea celulă-celulă, diferențierea celulară, aderența la substrat, protecția împotriva elementelor toxice și forța ionică ridicată, dar prezintă și un plus prin faptul că acționează ca molecule de stocare a carbonului și a energiei, provenind din capacitatea naturii de a se adapta și de a evolua în condiții impuse organismelor vii (Arima, Kakinuma & Tamura, 1968).

### **1.3 CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A BIOSURFACTANȚILOR**

Termenul de agent tensioactiv cuprinde o mare varietate de compuși, atât sintetici, cât și biologici, fiecare prezentând proprietăți tensioactive. Aceste molecule sunt de natură amfifilă, având atât domenii hidrofile, cât și hidrofobe care le permit să existe preferențial la interfața dintre mediile polare și nepolare (Soberón-Chávez & Maier, 2011).

Segmentul hidrofil al biosurfactanților este compus din esteri, grupări hidroxil, fosfat sau carboxil, sau carbohidrați, cum ar fi mono, oligo sau polizaharide, peptide sau proteine. Pe de altă parte, porțiunea hidrofobă poate fi alcătuită din substanțe saturate sau nesaturate, acizi grași, hidroxi acizi grași sau alcooli grași (Mulligan, Sharma & Mudhoo, 2014).

În timp ce surfactanții sintetici sunt clasificați prin analiza porțiunii lor polare, biosurfactanții pot fi clasificați în funcție de greutatea moleculară, compoziția chimică și originea microbială (Hayes, Solaiman & Ashby, 2019). În ceea ce privește greutatea moleculară, biosurfactanții se împart în surfactanți cu greutate moleculară mică, fiind reducători eficienți ai tensiunilor superficiale și interfaciale, dar și în surfactanți cu greutate moleculară mare, polimeri, care sunt agenți eficienți de stabilizarea emulsiei.

În ceea ce privește compoziția chimică, unele dintre clasele existente de biosurfactanți cu greutate moleculară mică sunt glicolipidele, fosfolipidele, acizii grași, lipopeptidele, în timp ce surfactanții cu greutate moleculară mare cuprind surfactanți polimerici și particulari (Hayes, Solaiman & Ashby, 2019). În ceea ce privește originea substanțelor microbiene, există o mare diversitate de microorganisme producătoare distribuite în cele mai variate genuri, care acoperă diferite specii de bacterii, drojdii și ciuperci filamentoase. Astfel de microorganisme sunt responsabile pentru producerea de biosurfactanți cu o diversitate structurală și funcțională remarcabilă.

**Glicolipidele** reprezintă o asociere între carbohidrați și substanțe lungi, lanțuri de acizi alifatici sau acizi alifatici hidroxilați, numite în funcție de carbohidrații prezenți în structura lor. Acest tip de biosurfactant are cea mai mare disponibilitate comercială dintre cei de origine microbială, cei mai cunoscuți fiind ramnolipidele, trehalolipidele, soforolipidele și lipidele de mannosio eritritol.

**Ramnolipidele** sunt compuse din ramnoză (carbohidrat) asociată cu lanțuri de  $\beta$ -hidroxilate acizi grași. Pe de altă parte, prezentând în structura sa dizaharida trehaloză asociată de o legătură esterică cu grupe de acizi grași, se produc **trehalolipidele** de diferite microorganisme, cele mai studiate aparținând speciei *Rhodococcus erythropolis*. Un alt microorganism producător de trehalolipide raportat în literatura de specialitate este reprezentat de ciuperca *Fusarium fujikuroi*. Soforolipidele sunt un tip de glicolipide produse de diverse drojdii din diferite genuri (*Starmerella*, *Candida*, și *Pseudohyphozyma*), prezentând o structură cu dizaharidul soforoză în legătură glicozidică cu un lanț lung de acid gras, ceea ce face posibilă apariția unui biosurfactant în formă lactonică și acidă.

Tot în clasa glicolipidelor se regăsesc **lipidele glucozice și lipidele de celuloză**. Neobișnuite în natură, lipidele de glucoză au un număr mic de microorganisme producătoare raportate, printre care se numără și *Serratia rubidaea*, al cărei biosurfactant, și anume rubiwettin RG1, este similar cu ramnolipidele care conțin glucoză.

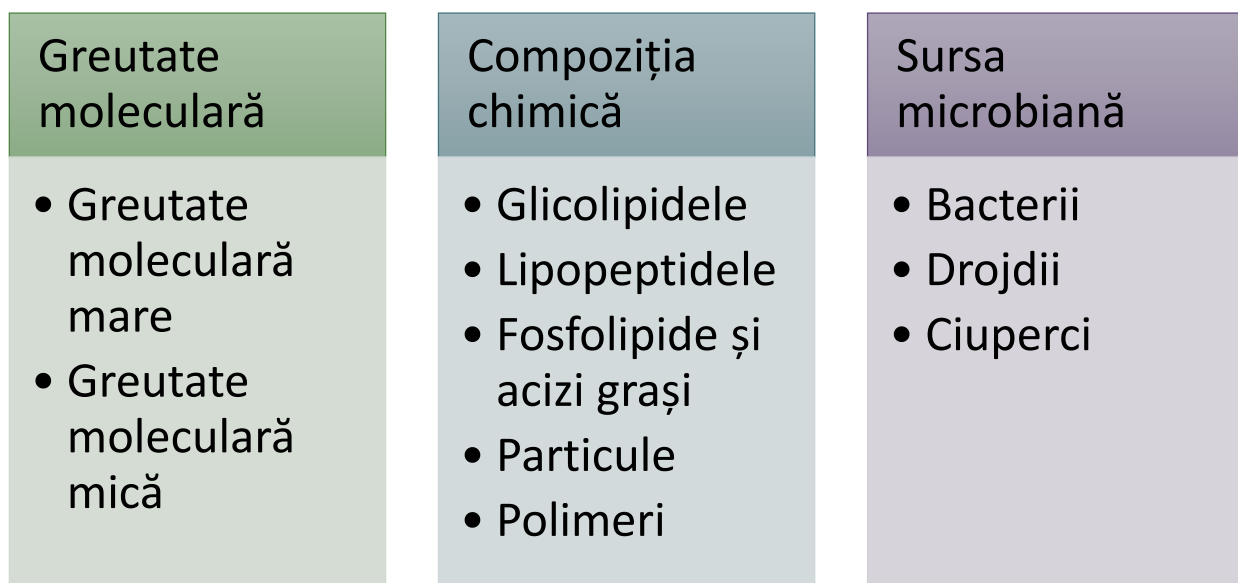
**Fosfolipidele și acizii grași** corespund lipidelor înzestrate cu una sau mai multe grupe fosfat și acizi carboxilici alifatici cu lanț lung. Aceste două structuri acționează ca biosurfactanți atunci când sunt produse de bacteriile și drojdiile care degradează hidrocarburile (Vieira et al., 2021).

**Lipopeptidele** sunt constituite din peptide ciclice acilate cu acizi grași a căror lungime și structură sunt variabile. Acești biosurfactanți sunt secretați în mediul de cultură de către diferite microorganisme, dar în special se remarcă *Bacillus* spp. și *Pseudomonas* spp. reprezentând speciile responsabile de producerea celor mai recunoscute lipopeptide, dar cu toate acestea, ciupercile și drojdiile sunt capabile să le producă și ele. Lipopeptidele au o mare varietate de structuri, dintre care multe sunt asemănătoare între ele, iar nomenclatura lor este lipsită de uniformitate. Unele dintre lipopeptidele produse de speciile *Bacillus* sunt surfactina, fengicina și iturina. Alte lipopeptide prezentate în literatura de specialitate și produse de alte microorganisme sunt polimixinele și serratina (Hayes, Solaiman & Ashby, 2019). Este important de subliniat faptul că descoperirea de noi lipopeptide este un fapt recurent. Acest lucru este atribuit diversității acestui tip de biosurfactant și la producerea sa diversificată prin diferite tulpini de organisme. Unele microorganisme producătoare de lipopeptide sunt *Brevibacillus* sp., *Alcaligenes aquatilis*, *Bacillus tequilensis*, și *B. subtilis* (Vieira et al., 2021).

Luând în considerare biosurfactanții cu greutate moleculară mare, se evidențiază faptul că cei polimerici pot modifica proprietățile reologice ale soluțiile apoase, chiar și la concentrații mici, pentru a fi utilizați ca agenți de îngroșare, dispersanți și stabilizatori ai emulsiilor, cu efect emulsionant și liposan (Mulligan, Sharma & Mudhoo,

2014). Un exemplu de microorganism producător de emulsii este bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*. Biosurfactanții particulari sunt vezicule extracelulare care ajută la absorbția hidrocarburilor de către celule este un microorganism producător de biosurfactant bine cunoscut. Odată cu progresul cercetărilor și al studiilor stimulate din necesitatea tot mai mare de a promova înlocuirea surfactanților sintetici cu biosurfactanți, care sunt din ce în ce mai eficienți în dezvoltarea durabilă a societății, se descoperă noi structuri producătoare de microorganisme.

**Figura 1.1** Modalități de clasificare a biosurfactanților

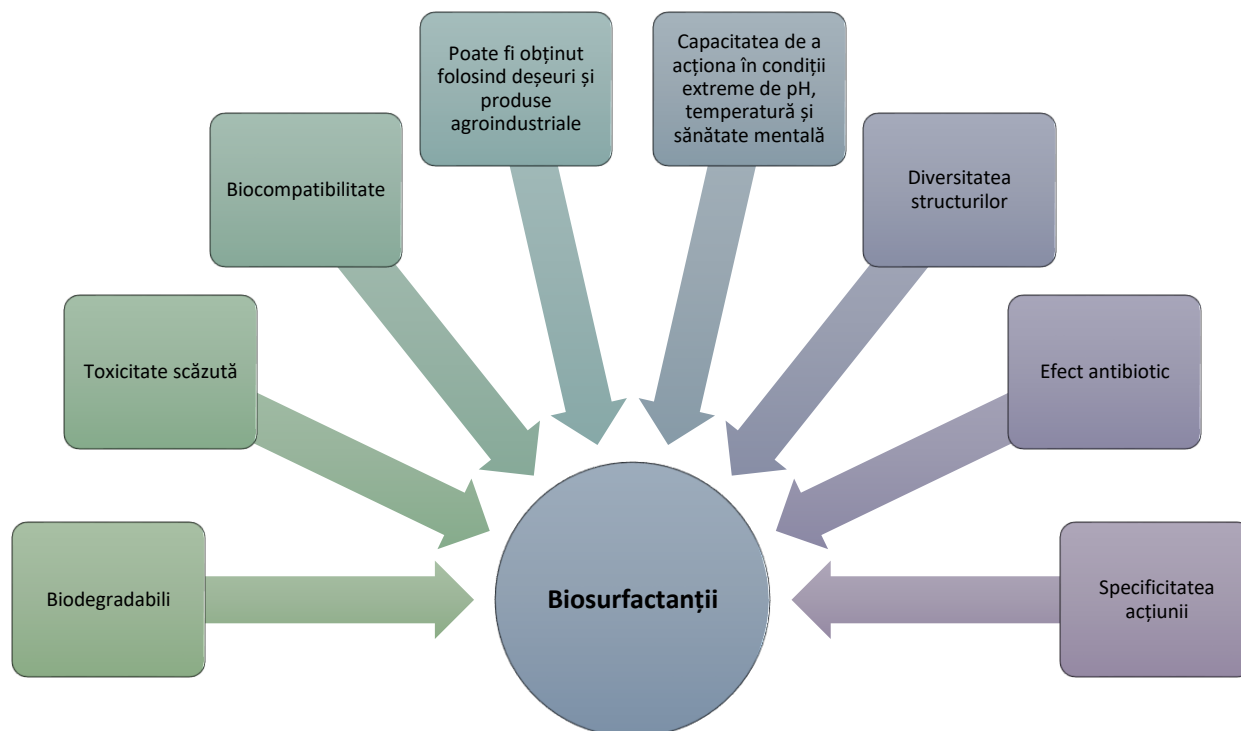


#### 1.4 CARACTERISTICI ȘI APLICABILITATE

Caracterul amfifilic al agenților tensioactivi este responsabil pentru fenomene de adsorbție și agregare, care influențează caracteristicile acestor compuși. Concentrația agentului tensioactiv este influențată direct de procesul de adsorbție, care are loc atunci când moleculele sale se acumulează la interfețe, fie că este vorba de solid-lichid, fie de lichid-lichid, sau aer-lichid.

Agenții tensioactivi sintetici și biosurfactanții au în comun caracteristica de a fi compuși ale căror molecule au un caracter amfifilic, prezentând astfel funcții similare, cum ar fi reducerea suprafeței și tensiunii interfaciale folosind aceleași mecanisme. Cu toate acestea, se remarcă diferențe relevante între aceste două tipuri de agenți tensioactivi care le afectează în mod semnificativ proprietățile, originea și materia primă utilizate în sinteza lor. În ceea ce privește originea, agenții tensioactivi sintetici sunt produși prin reacții chimice, în timp ce biosurfactanții sunt obținuți prin procese fermentative sau reacții biochimice. În timp ce agenții tensioactivi sintetizați chimic folosesc în principal derivați petrochimici ca materie primă, biosurfactanții folosesc substanțe organice ca materii prime și compuși cu lanțuri alifatică de carbon. Există însă și alte avantaje ale

biosurfactanților în comparație cu surfactanții sintetici, caracteristici care îi fac atractivi pentru aplicații mai durabile, așa cum se arată în figura 2.



**Figura 1.2** Caracteristici și aplicațiile avantajoase ale biosurfactanților.

Concurența dintre sintetic și biologic s-a intensificat, în special odată cu creșterea preocupării societății față de problemele de mediu. Mijloacele de producție a agenților tensioactivi sintetici combinate cu materiile prime utilizate și cu caracteristicile nefavorabile în comparație cu compușii naturali au dus la o creștere progresivă a interesului pentru biosurfactanți, care pot fi considerați fiind moleculele multifuncționale ale secolului XXI, fiind responsabile pentru punerea în aplicare a unei serii de procese industriale mai sustenabile datorită varietății mari de aplicații.

Astfel după cum s-a evidențiat în cele prezentate mai sus, datorită caracteristicilor lor unice, biosurfactanții produși de microorganisme pot fi folosiți în diferite aplicații, după cum se prezintă în tabelul 1.1.

**Tabelul 1.1** Aplicații potențiale pentru biosurfactanții produși de microorganisme.

Aplicații potențiale	Biosurfactant	Microorganism
Componentă în formularea detergentului	Nedeterminat	Bacillus subtilis
Îndepărtarea vopselei	Lipopeptidă	Corynebacterium aquaticum
Agent antibacterian	Sophorolipid	Starmerella bombicola

Remedierea hidrocarburilor aromatice policiclice	Glicolipide	Pseudomonas aeruginosa
Recuperarea îmbunătățită a petrolului cu ajutorul microbienelor	Lipopeptidă	Bacillus subtilis

Compuși cu caracteristici tensioactive au o mare relevanță pentru societate, deoarece aceștia sunt folosiți în diferite produse și procese într-o varietate de sectoare. Din cauza efectelor nocive legate de utilizarea agenților tensioactivi sintetici, agenții tensioactivi produși de microorganismele au apărut ca opțiuni pentru omologii lor sintetici datorită caracteristicilor lor favorabile din punct de vedere ecologic.

În ciuda interesului tot mai mare, biosurfactanții nu i-au depășit încă pe cei sintetici din punct de vedere comercial și, din păcate, sunt încă departe de a atinge acest obiectiv. Este necesar să se extindă diseminarea cunoștințelor pentru a oferi o înțelegere mai bună, nu doar asupra a ceea ce sunt biosurfactanții, ci și la mecanismele lor de acțiune, caracteristicile, parametrii fermentativi, aplicațiile și perspectivele de piață, permițând astfel ca acești compuși să devină unul dintre vestitorii unei societăți bazate pe dezvoltarea durabilă a activităților sale (Vieira et al., 2021).

## 1.5 DOVEZI EMPIRICE ANTERIOARE PRIVIND CONVERSIA MICROBIANĂ A SURSELOR DE CARBON ÎN BIOSURFACTANȚI

Studii anterioare au demonstrat că biosurfactanții sunt sintetizați de către izolatele din mediile bogate în surse de carbon (cum ar fi solul poluat cu hidrocarburi) sau produse cu ajutorul unor substanțe agricole dovedite fiind bogate în surse de carbon (Sachdev & Cameotra, 2013). Microbii producători includ *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Candida bombicola*, *Candida Antarctica* (Patel & Desai, 1997).

În multe cazuri, speciile de *Bacillus* și *Pseudomonas* s-au dovedit a fi potrivite pentru sintetizarea ramnolipidelor (Abouseoud et al., 2008). Sursele de carbon și de azot, precum și raporturile dintre carbon și azot sunt parametri influenți în producția de ramnolipide. Sursa de carbon este un parametru major în producția de biosurfactanți, care pot fi împărțiți în următoarele categorii: carbohidrați, hidrocarburi, uleiuri vegetale și compuși hidroxilici, de obicei polioli.

Producția de biosurfactanți de către tulpina *P. fluorescens* utilizând substraturi precum *n*-hexadecan, uleiul de măsline și glucoză, este fundamentată într-un studiu de specialitate (Abouseoud et al., 2008). Cel mai bun ramnolipid emulsifiant a fost format folosind uleiul de măsline ca sursă de carbon, fiind o substanță insolubilă în apă. Mai mult, creșterea a susținut producția de ramnolipide, care a fost obținută doar cu nitrat de sodiu și nitrat de amoniu, ca surse de azot. Cu toate acestea, randamentul și indicele de emulsionare a fost limitat cu glucoză și hexadecan ca surse de carbon din cauza inhibiției datorate scăderii pH-ului. Aceasta a fost o condiție probabil cauzată de producția de metaboliți acizi secundari, cum ar fi acidul uronic.

Dimpotrivă, glucoza prezintă un randament ridicat de biosurfactant, în timp ce uleiul de măsline prezintă cel mai mic randament. Mai mult decât atât au fost utilizate următoarele ca surse de carbon: glucoză, ulei de arahide, motorină, zaharoză și ulei de măsline, iar *P. aeruginosa* ca tulpină producătoare. În mod similar, Ramnolipidul biosurfactant a fost produs de *P. fluorescens* folosind glucoză, fructoză, manitol, glicerol, ulei de măsline și suc de caju ca surse de carbon. A fost raportat că în cazul sucului de caju s-a realizat cea mai bună emulsionare, creștere a biomasei, precum și reducerea tensiunii de suprafață. Între timp, există o diversitate în ceea ce privește ramnolipidele produse de speciile de *Pseudomonas*, deoarece a existat o gamă de congeneri (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Calea de producere a ramnolipidului indică faptul că *P. aeruginosa* poate utiliza surse de carbon pe bază de glucoză și ulei pentru sinteza ramnolipidului. Cu toate acestea, utilizarea glicerolului ca sursă de carbon ar putea avea o inițiere diferită a căii metabolice (Soberón-Chávez & Maier, 2011).

Mai mult, prezența atașamentelor hidrofile monorhamnosyl sau dirhamnosyl și a acizilor grași de diferite lungimi de lanț identifică fracțiunea hidrofobă a ramnolipidelor: compoziția depinde de tulpina bacteriană utilizată. Guo și colaboratorii au studiat folosind ulei de porumb ca sursă unică de carbon cu două tulpini mutante de *P. aeruginosa* (Guo et al., 2009). S-a stabilit că ramnolipidul predominant produs a fost un mono-ramnolipid cu un conținut ridicat de unul sau de două fracțiuni de acizi grași. Potrivit lui Saikia și colaboratorii, este posibilă sintetizarea ramnolipidului de către *P. aeruginosa*, dar nu au stabilit date cu privire la natura atașării ramnozei: fie ca mono- sau dirhamnosil (Saikia et al., 2012). Potrivit lui Mehdi et al., un studiu foarte asemănător cu cel al lui Saikia et al., a utilizat glicerolul ca unică sursă de carbon, dar a studiat influența diferitelor surse de azot și fosfor (Mehdi et al., 2011). Acesta a stabilit că *P. aeruginosa* cultivată pe glicerol ca sursă de carbon produce o fracțiune dirhamnosyl din ramnolipidul produs.

Un studiu realizat al carbonului și azotului a arătat că floarea-soarelui este o sursă de carbon adecvată pentru producția optimă de biosurfactanți de către *P. aeruginosa*. S-a stabilit o asemănare structurală cu studiul lui Chandankere și colaboratorii săi (Chandankere et al., 2013). Acesta a obținut un amestec de trei congener ramnolipide formate din fracțiuni de agregate mono-rhamno-mono-lipidice, mono-rhamnodi-lipidice și di-rhamno-di-lipidice, datorită amestecului de surse de carbon din mediu. Prin urmare, este bine cunoscut faptul că anumite utilități sau parametri de fermentare influențează produsul dorit, randamentul produsului sau comportamentul microbului producător. Printre aceste utilități sau parametri se numără sursa de carbon, sursa de azot, raportul carbon - azot, rata de aerare, temperatura și pH-ul mediului. S-a constatat, de asemenea, că izolatele de același specii cultivate pe diferite surse de carbon tind să se comporte diferit și astfel, producând diferiți biosurfactanți (Ehinmitola, Aransiola & Adeagbo, 2018).

# CAPITOLUL 2: PRODUCȚIA DE BIOSURFACTANȚI PE BAZA TULPINII MICROBIENE BACILLUS

---

## 2.1 SPECIILE BACILLUS ȘI ROLUL LOR ÎN MEDIU

Speciile de Bacillus sunt utilizate în numeroase aplicații medicale, farmaceutice, agricole și industriale, care profită de gama variată a acestora de caracteristici fiziologice și de capacitatea de a produce o serie de enzime, antibiotice și alți metaboliți. Bacitracina și polimixina sunt două antibiotice bine cunoscute, obținute din specii de Bacillus. Mai multe specii sunt utilizate ca standarde în testele medicale și farmaceutice.

Anumite specii de Bacillus sunt importante în cadrul proceselor naturale sau artificiale de degradare a produselor reziduale. Unii Bacillus patogeni de insecte sunt utilizați ca ingrediente active ale insecticidelor. Deoarece sporii multor specii de Bacillus sunt rezistenți la căldură, radiații, dezinfectanți și desecare, aceștia sunt dificil de eliminat din instalațiile medicale și farmaceutice și sunt o cauză frecventă de contaminare. Speciile de Bacillus sunt bine cunoscute în industria alimentară ca organisme de alterare (Turnbull, Kramer & Melling, 1996).

Rolul pe care îl are în mediul natural este evident și exemplificat în literatura de specialitate, acela de a conserva și de a înmulți informația genetică conținută în bacterie. Pe baza practicii bine-cunoscute de inducere a sporulației în laborator prin limitarea nutrienților, este în general acceptată că formarea sporilor de bacillus a evoluat ca mecanism de evadare atât spațială, cât și temporală din condițiile locale nefavorabile unei creșteri rapide (Nicholson et al., 2000).

Sporii pot fi găsiți în eșantioane de mediu obținute din aproape toate părțile, atât din suprafața cât și din subsolul Pământului.

Specia de Bacillus se remarcă prin faptul că este responsabilă de producerea celor mai recunoscute **lipopeptide**. Lipopeptidele au o mare varietate de structuri, dintre care multe sunt asemănătoare între ele, iar nomenclatura lor este lipsită de uniformitate. Unele dintre lipopeptidele produse de speciile Bacillus sunt **surfactina, fengicina și iturina**.

O paletă variată de studii au investigat utilizarea produselor de biocontrol pentru a depăși problemele de rezistență și de poluare. Printre aceste produse de biocontrol promițătoare, lipopeptidele Bacillus reprezintă o alternativă foarte bună la pesticidele chimice. Bacillus subtilis este o bacterie Gram-pozitivă din sol. Manipularea genomului său sau strategiile specifice de hrănire permit să se acționeze asupra reglării și orientării metabolismului său spre producerea de molecule de interes. Bacillus subtilis poate produce lipopeptide printr-un mecanism non-ribosomal, care are proprietăți biologice interesante.

Există o mare diversitate a acestor molecule, care prezintă mai mult de 100 de structuri diferite. Ele sunt clasificate în trei familii distincte în funcție de partea lor de aminoacizi: Fengicine

(fengicine și plipastatine), Iturine (micosubtiline, iturine și bacillomicine) și Surfactine (surfactine, pumilacidine, lichenizine). Surfactinele sunt lipopeptide ciclice compuse din 7 reziduuri de aminoacizi și un reziduu de acid gras  $\beta$ -hidroxi care diferă între ele prin părțile lor peptidice și prin lungimea acizilor grași. Surfactinele se remarcă în principal pentru activitatea lor biosurfactantă. Cu toate acestea, ele sunt cunoscute mai ales pentru efectul sinergic atunci când sunt combinate cu fengicina sau micosubtilina. Fengicinele sunt compuse din 10 aminoacizi (peptidă parțial ciclică) și dintr-un lanț lipidic  $\beta$ -hidroxilat. În funcție de diversitatea părții peptidice, au fost identificate diferite subgrupuri: fengycin A și B, plipastatin A și B și agrastatin A și B. Aceste molecule au activități antifungice și sunt capabile să inhibe creșterea unui număr mare de agenți patogeni ai plantelor, în special a ciupercilor filamentoase (Leconte et al., 2022).

## 2.2 ECOLOGIA SPORILOR DE BACILLUS ÎN SOL ȘI ROCI

În laborator, sporii de Bacillus sunt de obicei preparați prin cultivarea bacteriei la 37°C într-un nutrient lichid, mediu de sporulație pe bază de bulion nutritiv la o rată de creștere ridicată și la o densitate celulară ridicată până când un nutrient esențial, cum ar fi sursa de carbon, este epuizat din mediu (Nicholson, 1990). Deși se cunosc foarte puține lucruri despre creșterea sau sporularea Bacillus spp. în habitatele lor naturale, nu este dificil de imaginat că procesul diferă în mod semnificativ de modul în care sunt preparați sporii în laborator. Creșterea bacteriilor sporulante în mediile lor naturale, prezintă următoarele caracteristici:

- este mult mai lentă;
- se creează sub formă de microcolonii pe/și în interiorul unui substrat solid (de exemplu, agregate mari de particule de sol (Nicholson & Law, 1999));
- este supusă la variații mari de temperatură, umiditate, nutrienți și disponibilitatea oxigenului;
- se produce probabil în cadrul unor consorții sau în competiție directă cu alte micro și macroorganisme;

Deși este în general acceptat faptul că rezervorul primar al microbilor sporulatori și al sporilor acestora este solul, nu se cunosc foarte multe despre fiziologia și dinamica populației de germinare, creștere și sporulare la nivelul solului.

Studiile ulterioare din anii 1930 până în anii 1960, au examinat mai îndeaproape distribuția microflorei solului în diferite orizonturi de sol, evidențiind o imagine mult mai dinamică a formării sporilor Bacillus spp. în soluri, inclusiv variații sezoniere în ceea ce privește numărul, distribuția și predominanța diferitelor Bacillus spp. (Siala, Hill & Gray, 1974). Utilizând anticorpi fluorescenți direcționați fie împotriva celulelor vegetative, fie împotriva sporilor de Bacillus subtilis, Siala Hill și Gray au efectuat o examinare amănunțită a distribuției celulelor vegetative și a sporilor în cei 20 cm superiori ai unui sol de pădure de pin și au constatat că:

- celulele și sporii au fost asociate în principal cu particule în descompunere, chiar dacă 85% din totalul particulelor de sol erau de origine minerală (nisip de cuarț);
- majoritatea celulelor vegetative au fost găsite în celulele organice din apropierea suprafeței (A1), orizont acid asociat cu particule de pin în descompunere, frunze și tulpini de pin;
- majoritatea sporilor au fost găsiți în orizontul alcalin în mare parte mineral (C) situat imediat sub orizontul A1, și au fost asociate cu particule de rădăcini de pin în descompunere (Siala, Hill & Gray, 1974).

Siala și Gray au efectuat experimente pentru a monitoriza soarta celulelor *Bacillus subtilis* în medii de laborator și aplicate pe sticlă lamele care au fost apoi puse în contact cu solul. Ei au arătat că germinarea sporilor și creșterea celulelor vegetative de *Bacillus subtilis* în sol au prezentat proprietăți complet diferite atunci când experimentele au fost efectuate în sol sterilizat față de solul care conținea microflora sa normală. Creșterea și germinarea celulelor sau a sporilor de *Bacillus subtilis* inoculate în orizontul A1 al solului au fost inhibitate de contactul cu rădăcinile de pin. În contrast puternic, germinarea sporilor și creșterea celulelor vegetative au fost asociate în mod specific cu creșterea și dezvoltarea hifelor fungice din orizontul sol. Într-adevăr, celulele vegetative au fost observate crescând în apropierea directă a miceliilor fungice (Siala & Gray, 1974).

Mai recent, au apărut numeroase rapoarte care documentează apariția *Bacillus* spp. ca membri ai rizoplanei și rizosferă a diferitelor plante sălbatice și cultivate. Aceste studii au început să contureze începuturile unui portret mai complex și mai detaliat al vieții *Bacillus* spp. sporulante în sol și au condus la utilizarea sporilor de *Bacillus* ca agenți de biocontrol și probiotici (Nicholson, 2002).

Literatura de specialitate recentă indică faptul că o mare varietate de viață microbiană (numită microbi endolitici) locuiește în rocile care se întind de la regolitul de suprafață (stratul de rocă spartă și sol care acoperă stratul consolidat de rocă de bază, consolidată pe majoritatea maselor terestre ale Pământului) până în adâncurile rocilor subterane (Fredrickson & Onstott, 1996). Mai mulți *Bacillus* spp. au fost izolate în interiorul unor locații precum lacurile de rocă de mangan din Sonoran, Mohave și Negev, în roci deșertice din deșertul Mohavean și Negev, în foraje subterane profunde și în formațiuni de granit aproape de suprafață (Hungate et al., 1987).

## 2.3 EXPLOATAREA SPORILOR DE CĂTRE OM

### 2.3.1 Sporii ca biosimetre

Datorită proprietăților lor de rezistență extremă, bacteriile au fost utilizate de mult timp ca biosimetre pentru verificarea diferitelor regimuri de dezinfecție și sterilizare. Un exemplu obișnuit este utilizarea *Bacillus stearothermophilus* pentru a testa eficiența autoclavelor. Subiectele

utilizării sporilor de *Bacillus subtilis* ca biosimetre pentru monitorizarea performanței dezinfecției cu ultraviolete (UV) reactoarelor pentru sistemele de purificare a apei potabile și a expunerii la radiația UV solară au fost analizate recent (Hoyer, 1998; Berces et al., 1999).

### 2.3.2 Sporii ca agenți de control biologic

Utilizarea sporilor diferitelor *Bacillus* spp. ca pesticide naturale nu este nouă, iar "biopesticidele" au fost de mult timp folosite ca pesticide naturale, prezentate ca alternative sigure și ecologice la pesticidele tradiționale. Cu toate acestea, biopesticidele naturale exercită, de asemenea, un impact asupra mediului care, a fost apreciat doar după ce utilizarea lor a devenit instituționalizată. De exemplu, se știe că *Bacillus popilliae* este utilizat de câteva decenii ca agent de control la infestările de gândaci japonezi, dar producția de spori la scară largă este împiedicată de incapacitatea bacteriei de a sporula în afara larvelor gazdă (Stahly & Klein, 1992). În plus, distribuția pe scară largă a *Bacillus popilliae* în mediul înconjurător prin oameni a fost recent pusă sub semnul întrebării, din cauza faptului că bacteria codifică o rezistență naturală la vancomicina, un antibiotic important de "ultimă linie de apărare", pentru uz uman. Pentru combaterea larvelor de lepidoptere (omizi), sporii de *Bacillus thuringiensis* (Bt) au reprezentat un succes comercial răsunător: Bt reprezintă mai mult de 90 % din toate produsele comercializate, bioinsecticide comercializate, cu o piață mondială de peste 100 de dolari. În ciuda faptului că Bt are în general performanțe mai bune decât pesticidele chimice tradiționale în ceea ce privește selectivitatea țintei, persistă îngrijorările cu privire la faptul că insecticidele Btucid. Astfel de preocupări au devenit deosebit de acute în coincidență cu introducerea și exprimarea toxinei cristaline Bt direct în plantele de cultură. În mod similar, preparatele de spori de *Bacillus sphaericus* sunt utilizate pe scară largă pentru combaterea speciilor de diptere, în special a larvelor de țânțari, iar studiile efectuate până în prezent tind să indice puține efecte nocive notabile asupra organismelor nevizate (Nicholson, 2002).

Succesele recente ale lui *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis* ca fungicide naturale și bacterii care favorizează creșterea plantelor atunci când sunt inoculate direct în soluri ca pretratament al semințelor a dat naștere unei noi generații de studii privind stabilirea și supraviețuirea populațiilor de bacterii care formează spori în soluri.

Un succes suplimentar în ceea ce privește sporirea stabilirii și supraviețuirii populațiilor de inoculanți bacterieni în sol a fost obținut prin încapsularea microbilor într-o varietate de materiale polimerice, care pot oferi o sursă atât de nutriție pentru inoculantul cât și de protecție a inoculantului împotriva factorilor dăunători din sol (van Veen, van Overbeek, & van Elsas, 1997). Există o creștere sinergică a eficacității bioinsecticidelor care conțin atât sporii, cât și endotoxina de *B. thuringiensis*. Cu toate acestea, atunci când se utilizează în comerț, preparatele comerciale care conțin amestecuri de *B. thuringiensis* și incluziuni cristaline sunt utilizate pentru combaterea insectelor, componenta de spori dispare rapid din câmp, fapt care se poate atribui, cel puțin în parte, sensibilității solare la UV a sporilor. Încercările empirice de a ocoli această problemă s-au concentrat pe încapsularea agentului de biocontrol sau pe izolarea tulpinilor rezistente la UV prin

iradierea cu UV a sporilor în laborator sau prin expunerea sporilor la lumina soarelui (Jones et al., 1991).

## 2.4 EVOLUȚII ÎN UTILIZAREA SPECIILOR DE BACILLUS PENTRU PRODUCȚIA INDUSTRIALĂ

Speciile de Bacillus sunt microorganisme de interes industriale majore, având un rol important în microbiologia aplicată, care datează de mai bine de o mie de ani, de la producerea de natto prin fermentarea în stare solidă a boabelor de soia folosind Bacillus subtilis. Dezvoltarea tulpinilor și a strategiilor de producție a fost recent influențată de aplicarea tehnicilor de biologie moleculară.

Speciile de Bacillus sunt organisme industriale atractive din mai multe motive, printre care viteze de creștere ridicate care conduc la timpi scurți ai ciclurilor de fermentare, capacitatea lor de a secreta proteine în mediul extracelular, precum și statutul pentru specii precum Bacillus subtilis și Bacillus licheniformis. În plus, în prezent se cunosc multe despre biochimie, fiziologie și genetică a Bacillus subtilis și a altor specii, ceea ce facilitează dezvoltarea ulterioară și o mai mare exploatare a acestor organisme în procesele industriale. Studiul complet genomului pentru Bacillus subtilis 168 a fost publicat recent, iar genomurile pentru o serie de alte specii se află într-un stadiu avansat de dezvoltare. Aplicațiile recente ale analizei filogenetice, ale ADN-ADN hibridizare și a altor tehnici moleculare la clasificarea bacteriilor conduc la reclasificarea unei serii de specii de Bacillus și la crearea de noi genuri. De exemplu, fostele Bacillus stearothermophilus și Bacillus brevis au fost reclasificate ca Geobacillus stearothermophilus și, respectiv, Brevibacillus brevis (Schallmey, Singh & Ward, 2004).

### 2.4.1 PRODUCȚIA INDUSTRIALĂ DE ENZIME

Piața mondială a enzimelor industriale este estimată la 1,6 miliarde de dolari, împărțită între enzimele alimentare (29%), enzimele pentru hrana animalelor (15%) și enzimele tehnice generale (56%) (Outtrup și Jorgensen, 2002). Principalele aplicații sunt rezumate în tabelul 2.2 Cele mai multe enzime detergente în prezent utilizate pe piață sunt enzimele Bacillus spp. cu serină. Se estimează că enzimele Bacillus spp. reprezintă aproximativ 50% din piața totală a enzimelor. Există trei furnizori dominanți de enzime, Novo Nordisk, Genencor International și DSN N.V., care au raportat cote de piață de 41%-44%, 21% și, respectiv, 8%, cu producători mai mici din America de Nord, Europa, Japonia și China, care reprezintă restul de 27%-30%. Speciile alcalofile produc enzime cu o toleranță alcalină mai mare, utilizate în formulări de detergenți de mare putere. Enzimele neutre din Bacillus spp. sunt enzime de zinc metaloproteinaze, cu pH optimi în jurul valorii de 7, care sunt utilizate în modificarea proteinelor din lapte, controlul azotului, extracția maceratului, modificarea compoziției de soia pentru utilizare ca arome și în hrana animalelor (Schallmey, Singh & Ward, 2004).

Amilazele Bacillus spp. au aplicații într-o serie de procese industriale, cum ar fi cele alimentare, de fermentare, textile, și industria hârtiei.  $\alpha$ -Amilaza din Bacillus spp. scindează legăturile  $\alpha$ -1,4 interne în mod endo. Capacitatea extraordinară a  $\alpha$ -amilazei din B. licheniformis de a funcționa la

95 °C și de a rezista la temperaturi de 105- 110 °C pentru perioade scurte de timp face din aceasta o enzimă industrială unică pentru lichefierea amidonului, în special a amidonului de porumb, care se gelatinizează numai la 100 °C.  $\beta$ -amilazele din speciile de *Bacillus* acționează pentru a îndepărta unitățile de maltoză în mod exo din amidon, dar nu pot ocoli legăturile  $\alpha$ -1,6-glicozidice.

**Tabelul 2.2** Aplicații industriale a enzimei de *Bacillus* spp.

Industria (%)	Principalele enzime de <i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Alte enzime
Detergenți (37)	Enzime alcaline	<i>B. clausii</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. halodurans</i>	Lipaze și celule fungice
	Amilază alcalină	<i>B. licheniformis</i> <i>B. halmapalus</i>	
Amidon (13)	$\alpha$ -Amilază	<i>B. licheniformis</i>	Glucoamilază fungică;
	Pullulanase	<i>G. stearothermophilus</i>	Glucoză izomerază din <i>Streptomyces</i>
Textile (6)	Amilază	<i>B. halodurans</i>	Celule fungice
Produse lactate (14)	Nici unul	Cheaguri de vițel și (sau) de ciuperci	
Coacere (9)	Amilază	<i>B. licheniformis</i>	
Băuturi (6)	Amilază	<i>B. licheniformis</i> <i>G. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	Majoritatea enzimelor fungice

Baciliile produc o serie de produse cu aplicații industriale. Câteva dintre produsele cu aplicații industriale sunt prezentate în tabelul 2.3.

**Tabelul 2.3** Produse provenite de la *Bacillus* spp

Produse	Aplicații	Specii de <i>Bacillus</i>
Endotoxine	Biopesticide, insecticide	<i>B. thuringiensis</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. sphaericus</i></li> <li>• <i>B. popilliae</i></li> <li>• <i>B. lentimorbus</i></li> </ul>
Nucleotide purinice	Îmbunătățitori de gust, medicamente	<i>B. subtilis</i>
Riboflavină	Ingredient pentru vitamine privind alimente sănătoase	<i>B. subtilis</i>

Acid poli- $\gamma$ -glutamic	Folosit ca agent de îngroșare, suport pentru medicamente, biopolimer, aditiv pentru hrana animalelor	B. subtilis
D-Ribose	Îmbunătățitor de aromă în alimente, alimente sănătoase, produse farmaceutice, produse cosmetice	B. subtilis B. pumilus
Thaumatococ	Proteină cu gust dulce pentru aplicații în industria alimentară și farmaceutică	B. subtilis
Polihidroxibutirat	Materiale plastice biodegradabile	B. megaterium
Streptavidină	Proteină de legare a biotinei, aplicații în biocipuri de înaltă densitate	B. subtilis

## CAPITOLUL 3: PRODUCȚIA DE BIOSURFACTANȚI PE BAZA TULPINII MICROBIENE PSEUDOMONAS

---

### 2.1 DESCRIEREA GENULUI PSEUDOMONAS

Organismele bacteriene care compun genul *Pseudomonas* sunt omniprezente în natură și se dezvoltă în nișe ecologice foarte diferite, inclusiv în soluri, apă, sedimente, aer și medii umane (Mulet et al., 2010). Membrii *Pseudomonas* beneficiază de o mare versatilitate metabolică și un potențial de adaptare foarte mare la condiții de mediu dificile. Genul include linii de specii patogene, cum ar fi *Pseudomonas aeruginosa*, care au evoluat rezistența la majoritatea claselor de agenți antimicrobieni de uz clinic, inclusiv opțiunile terapeutice de ultimă instanță, cum ar fi carbapenemele. Transferul orizontal al genelor de rezistență de la alte bacterii care locuiesc în aceleași nișe ecologice a contribuit cu siguranță la capacitatea *P. aeruginosa* de a evolua (Yoon și Jeong, 2021).

*Pseudomonas* spp. sunt bacili Gram-negativi subțiri, în formă de tijă, care nu formează spori, cu un conținut de guanină/citozină de 57-68 % molari. *Pseudomonas* spp. sunt mobile datorită unuia (de exemplu, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. oryzae*) sau mai multor flageli polari (de exemplu, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*). *Pseudomonas* spp. inclusiv *P. aeruginosa* pot fi recuperate din specimene clinice și de mediu folosind tehnici standard de colectare, transport și depozitare și pot fi cultivate folosind medii standard în bulion sau medii solide, inclusiv toate mediile neselective (de exemplu, Columbia sau agarul triptic-soia), precum și o serie de medii selective. În timp ce mediile selective care conțin inhibitori precum acetamida, nitrofurantoina sau ceftriaxonă pot fi utile pentru izolarea *Pseudomonas* spp., a fost raportată inhibarea unor tulpini de *P. aeruginosa* de către ceftriaxonă și acid nalidixic (Brodan et al., 2021).

Diferite caracteristici fenotipice și chimiotaxonomice au fost utilizate pe scară largă în clasificarea *Pseudomonas*, dar abordări mult mai fiabile sunt reprezentate de procedurile bazate pe genomică (Mulet et al., 2010). În acest context, abordările de analiză a secvenței multilocus care utilizează genele de bază selectate, cum ar fi genele 16S rDNA, *gyrB*, *rpoB* și *rpoD*, au fost utilizate pe scară largă pentru o definiție mai precisă a limitelor "speciilor" între izolatele de *Pseudomonas* (Mulet et al., 2010). Astfel, s-au definit (cel puțin) 21 de specii în cadrul așa-numitului grup *P. putida* G, cum ar fi: *P. putida*, *P. monteilii*, *P. fulva*, *P. mosselii* și speciile *P. putida* G nou atribuite, cum ar fi *P. asiatica* și *P. juntendi*, au fost asociate mai recent cu infecții umane. Deși majoritatea izolatelor clinice de *P. putida* G au prezentat în trecut o sensibilitate generală la majoritatea antimicrobienele utilizate în clinică, mai recent a fost raportată o rezistență emergentă la carbapeneme în rândul acestora (Brodan et al., 2021).

## 2.2 TULPINILE DE PSEUDOMONAS PREZENTE ÎN SOL

Tulpinile de *Pseudomonas* au fost adesea izolate din soluri contaminate cu compuși insolubili în apă, cum ar fi produse petroliere (MacElwee, Lee & Trevors, 1990). În mediile contaminate cu benzină fără plumb, un recent studiu a arătat că acestea erau deosebit de abundente, deoarece au fost identificate până la 86% din pseudomonade în cele 244 de izolate. Expunerea la poluanții hidrofobi din solurile contaminate a părut pentru a selecta producătorii de biosurfactanți care pot emulsiona compușii hidrofobi (Francy et al., 1991). În aceste condiții specifice, speciile de *Pseudomonas* au capacitatea de a produce biosurfactanți. Cu toate acestea, această proprietate nu părea să fie împărțită de alte tulpini din această specie care au fost izolate din medii necontaminate (Persson & Mollin, 1987). Biosurfactanții produși de *Pseudomonas aeruginosa* au fost caracterizați ca fiind ramnolipide. S-a constatat că acestea cresc dispersia compușilor hidrofobi în apă și au posibilitatea să sporească recuperarea din sol a hidrocarburilor poliaromatice (PAH). Îmbunătățirea biodegradării hidrocarburilor în sol prin adăugarea unui inocul de *Pseudomonas aeruginosa* a eșuat, posibil din cauza faptului că tulpina nu s-a stabilit cu succes în noul mediu (Jain, Lee & Trevors, 1992).

Proprietățile de suprafață ale celulelor sunt reprezentate de alți factori care determină rata de degradare a substraturilor hidrofobe, după cum au arătat Rosenberg și Rosenberg în 1981 pentru *Acinetobacter calcoaceticus*. Celulele care prezintă proprietăți hidrofobe ridicate pot adera la substraturi cum ar fi n-hexadecanul sau alți n-alcani. În cazul *Pseudomonas*, hidrofobitatea celulară poate varia într-o anumită măsură, celulele care prezintă cele mai mari hidrofobii fiind clasificate ca fiind cele mai rapide degradatoare de hidrocarburi. Proprietățile hidrofobice ale celulelor explică, de asemenea, și aderența microorganismelor la suprafețe solide, cum ar fi polistirenul încărcat negativ (Arino, Marchal & Vandecasteele, 1996; Arino, Marchal & Vandecasteele, 1996).

## 2.3 ROLUL PSEUDOMONAS ÎN DEGRADAREA CLORPIRIFOSULUI

Clorpirifosul este un pesticid organofosforic utilizat în mod obișnuit în agricultură. Acesta este nociv pentru o varietate de organisme care includ biota vie din sol, alături de artropode benefice, pești, păsări, oameni, animale și plante. Expunerea la clorpirifos poate provoca efecte dăunătoare, cum ar fi apariția întârziată a răsadurilor, deformări ale fructelor și diviziune celulară anormală. Contaminarea cu clorpirifos a fost descoperită la o distanță de aproximativ 24 km de locul de aplicare a acestuia. Există numeroase aspecte fizico-chimice și biologice pentru a elimina pesticidele organofosforice din ecosistem, printre care cele mai promițătoare sunt 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) și dietiltiofosfat (DETP) ca produse primare, obținute atunci când clorpirifosul este degradat de microorganismele din sol care se descompune ulterior în metaboliți netoxici precum CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O și NH<sub>3</sub>. *Pseudomonas* este un gen diversificat care posedă o serie de căi catabolice și enzime implicate în degradarea pesticidelor. *Pseudomonas putida* MAS-1 este raportat ca fiind mai eficient în degradarea clorpirifosului cu o rată de 90 % în 24 ore în rândul genului *Pseudomonas* (Gilani et al., 2016).

Una dintre etapele principale în degradarea clorpirifosului este metabolizarea și mineralizarea. Microorganismele din sol joacă un rol vital în degradarea și mineralizarea acestor metaboliți. Distribuția bacteriilor endofite a fost raportată pentru prima dată de Gardner (Gardner, Feldman & Zablutowicz, 1982). Speciile dominante de endofite sunt *Pseudomonas* (40%) și *Enterobacter* (18%).

*Pseudomonas* este grupul de bacterii prezente în cantitate mare în sol și au un rol vital în mineralizarea materiei organice. Acestea sunt adaptabile din punct de vedere metabolic și au capacitatea de a degrada majoritatea hidrocarburilor aromatice, produse petroliere și pesticide. Degradarea erbicidelor de către *Pseudomonas* endofitice este raportată de către Germaine și colaboratorii săi (Germaine et al., 2006). Pe lângă aceasta, *Pseudomonas* au capacitatea de a mineraliza compușii fenolici. O varietate de compuși cu greutate moleculară mică, inclusiv hidrocarburi alifatiche clorurate au fost, de asemenea, metabolizate de *Pseudomonas* datorită gamei diversificate, prin urmare, este cel mai utilizat pe scară largă în procesul de degradare. O singură specie bacteriană de genul *Pseudomonas* poate utiliza un număr de substraturi ca hrană, de exemplu, doar *Pseudomonas cepacia* are capacitatea de a utiliza peste 100 de tipuri diferite de substraturi ca sursă unică de C, N sau S (Dagley, 1986). Două genuri mari, *Pseudomonas* și *Bacillus*, au o gamă largă de enzime care le permite să degradeze multe pesticide. Tulpinile de *Pseudomonas* au găzduit o singură plasmidă capabilă să degradeze clorpirifosul (Bhagobaty & Malik, 2010).

În mod similar, alte câteva specii bacteriene au capacitatea de a degrada clorpirifos în medii lichide, cum ar fi, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Providencia*, *Serratia* și *Synechocystis*. A fost raportat că o degradare de 75-87% a clorpirifosului a fost realizată de aceste genuri bacteriene, inclusive *Pseudomonas fluorescens*, *Brucella melitensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp., *S. marcescens* și *Pseudomonas aeruginosa*. În studiu efectuat de Maya și colaboratorii săi, au fost analizate diferite tulpini bacteriene pentru a fi evaluate privind potențialul de degradare a clorpirifosului prin analiză cinetică. Dintre acestea, s-a constatat că *Pseudomonas* are un potențial de degradare ridicat datorită răspândirii pe scară largă, urmat de *Agrobacterium* și *Bacillus* (Maya et al., 2011).

Consumul de TCP (3,5,6 triclolo-2-piridinol) ca sursă unică de carbon și energie de către *Pseudomonas* ATCC 700113 în condiții aerobe a fost observată ca o declorinare reductivă în degradarea acestuia. TCP are ca rezultat producerea de dioxid de carbon, apă, clorură, amoniu și unii metaboliți polari neidentificați. Dintre *Pseudomonas*, *P. putida* și *P. aeruginosa* s-au dovedit a fi specii eficiente de degradare a clorpirifosului. *P. aeruginosa* este o bacterie gram negativă din sol și are capacitatea de a degrada clorpirifosul. Aceasta poate utiliza TCP și prin urmare, este considerată a fi mai eficientă decât altele, având rata de supraviețuire în sol mai bună. *Pseudomonas aeruginosa* degradează 87 % clorpirifos în solul din câmpurile de orezârie, catabolic în 20 de zile în mediu lichid, în timp ce 92% este raportat în 30 de zile pentru mediul de sol la 37 °C. *Pseudomonas aeruginosa* degradează complet clorpirifosul în 7 zile (Fulekar & Geetha, 2008).

*Pseudomonas putida* este o plantă saprotrofă, gram-negativă, în formă de tijă cu formă de coadă rotundă. Este un prim izolat bacterian de tip sălbatic care poate degrada compuși organofosforici. *Pseudomonas putida* este o tulpină fiabilă de manipulat în comparație cu *Pseudomonas aeruginosa* care este un agent patogen uman oportunist, iar datorită acestei capacități, *Pseudomonas putida* a câștigat mai multă importanță decât alte specii de *Pseudomonas*, în special în procesul de degradare (Carpenter et al., 2008). *Pseudomonas putida* utilizează 90 % din clorpirifos ca sursă de energie în timpul primelor 24 de ore, când e cultivat în mediu cu conținut minim de sare. *P. putida* realizează mai bine în condiții optimizate, deoarece rata de degradare este de 24 h în condiții optimizate și 10 zile în condiții neoptimizate. Aceasta degradează 38 % din clorpirifos la pH 7, 36% la 35 °C, 42% la 10 ml mărimea inoculului, 38% la o concentrație de 2% de pesticid, 62% la o viteză de agitare de 150 rpm, 57% la glucoză și 68% la la sursa de azot drojdie, 40% la KNO<sub>3</sub> (Vijayalakshmi & Usha, 2012). Tulpina *Pseudomonas ChID* are capacitatea de a degrada clorpirifos prin producerea de surfactant și sunt izolate prin tehnica de cultură prin îmbogățire din solul agricol, contaminat cu clorpirifos. Tulpina *Pseudomonas ChID* este capabilă să degradeze 98% din clorpirifos în 120 de ore, în comparație cu 84% în absența biosurfactantului rhamnolipid. *Pseudomonas stutzeri* B-CP5 are capacitatea de a degrada pesticidul de clorpirifos în 7 zile de la o instalație contaminată cu clorpirifos, modul de degradare fiind catabolic la pH 7 și temperatura de 30 °C. *Pseudomonas nitroreducens* PS-2 este izolat din solul rizosferic al secarei îmbibat cu clorpirifos. Acesta prezintă o degradare de 100% a clorpirifosului după 28 de zile în rizosfera inoculată (Korade & Fulekar, 2009). Mineralizarea TCP are ca rezultat eliberarea de CO<sub>2</sub> și ioni de clorură de către tulpina *Pseudomonas* sp. ATCC 700113 atunci când este cultivată într-un mediu de sare minerală. Aproximativ 72,4% CO<sub>2</sub> este recuperat ca radioactivitate inițială, 9% a rămas în mediu, iar 4,1% în biomasă. *P. desmolyticum* NCIM 2112 este capabil să degradeze clorpirifos în proporție de 98% în 6 zile. Conform parcursului propus de degradare a clorpirifosului de către *P. desmolyticum* NCIM 2112, clorpirifosul este mai întâi transformat în DETP și TCP, unde DETP este degradat ulterior în tiofosfat, iar TCP în 2-piridinol (Gilani et al., 2016).

Genul bacterian *Pseudomonas* a fost evidențiat pentru capacitatea de a degrada clorpirifos la o rată diferită, cum se poate observa în tabelul 2.5. Dintre toate speciile de *Pseudomonas*, maximul de rata de degradare este observată de tulpina *Pseudomonas ChID* ca fiind de 98 % în 120 h. *Pseudomonas aeruginosa* a înregistrat o rată de 87-92 % în 20-30 de zile și *Pseudomonas putida* MAS-1 90% în 24 h. *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 cu o rată de degradare de 98% în 6 zile. *Pseudomonas* sp. BF1-3 97% în 9 zile și *Pseudomonas nitroreducens* PS-2 cu rata de degradare 100% în 28 de zile. Dintre acestea, *Pseudomonas putida* MAS-1 este mai eficientă în ceea ce privește degradarea clorpirifosului cu o rată de degradare de 90% clorpirifos în 24 h după care tulpina *Pseudomonas ChID* este de 84% în 120 h, iar degradarea completă este observată de *Pseudomonas nitroreducens* PS-2 în 28 de zile.

**Tabelul 2.5** Degradarea clorpirifosului de către speciile de *Pseudomonas*

<i>Pseudomonas</i> sp.	Rata de degradare (%)	Durata (h)	Mediu
<i>P. diminuta</i>	12	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	92	720	Sol
<i>P. aeruginosa</i> (NCIM 2074)	100	168	-
<i>P. fluorescence</i>	43	240	-
<i>Pseudomonas</i> ATCC700113	72,4	-	Mediu de săruri minerale
<i>P. putida</i> MAS-1	90	24	Mediu de săruri minerale
<i>Pseudomonas</i> strain ChID	84	120	-
<i>Pseudomonas</i> sp. BF1-3	97	216	-
<i>P. desmolyticum</i> NCIM 2112	98	144	Mediu pe bază de minerale
<i>Pseudomonas</i> strain WW5	94	432	Efectele din industria de scurgere
<i>P. nitroreducens</i> PS-2	100	672	Solul Rhizosferic de secară
<i>P. sutzeri</i>	88	192	-
<i>P. stutzeri</i> B-CP5	-	168	Sol
<i>Pseudomonas</i> sp. (iso 1)	91	312	-

Diferiți factori care afectează rata de bioremediere sunt temperatura, pH-ul, sursa de nutrienți de carbon și azot. Degradarea clorpirifosului de către microorganismele din sol este puternic afectată de pH-ul solului. S-a raportat că absorbția erbicidului de către microorganismele din sol poate afecta rata de degradare și este influențată de pH-ul solului. *Pseudomonas* prezintă o degradare maximă la pH 8 deoarece la un pH ridicat, enzimele au o activitate optimă. În solurile cu pH ridicat, TCP este metabolizat în CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O și NH<sub>4</sub> prin calea de declorinare reductivă de către un *Pseudomonas*. *Pseudomonas* se adaptează cel mai bine la concentrații scăzute de pesticide, degradarea clorpirifosului scade odată cu creșterea concentrației acestuia, deoarece concentrația ridicată afectează microorganismele implicate în degradare (Gilani et al., 2016).

## CAPITOLUL 4. CONCLUZII

---

Compușii de origine sintetică sau biologică, compuși cu caracteristici tensioactive au o mare relevanță pentru societate, deoarece aceștia sunt folosiți în diferite produse și procese într-o varietate de sectoare. Din cauza efectelor nocive legate de utilizarea agenților tensioactivi sintetici, agenții tensioactivi produși de microorganisme au apărut ca opțiuni pentru omologii lor sintetici datorită caracteristicilor lor favorabile din punct de vedere ecologic. În ciuda interesului tot mai mare, biosurfactanții nu i-au depășit încă pe cei sintetici din punct de vedere comercial și, din păcate, sunt încă departe de a atinge acest obiectiv. Este necesar să se extindă diseminarea cunoștințelor pentru a oferi o înțelegere mai bună, nu doar asupra a ceea ce sunt biosurfactanții, ci asupra mecanismele lor de acțiune, caracteristicilor, parametrilor fermentativi, aplicațiilor și perspectivelor de piață, permițând astfel ca acești compuși să devină unul dintre vestitorii unei societăți bazate pe dezvoltarea durabilă a activităților sale.

Mai mulți factori de mediu și operaționali, cum ar fi sursa de carbon și azot, raportul carbon/azot, mineralele, regulatorii metabolici (inhibitori și inductori) sau salinitatea, au un impact asupra sintezei biosurfactanților (Kashif et al., 2022). Cu toate acestea, substratul de carbon este critic în crearea biosurfactantului și are un impact substanțial asupra randamentului și calității, care poate fi împărțit în următoarele categorii: carbohidrați; hidrocarburi; uleiuri vegetale și compuși hidroxil, de obicei polioli (Moufao et al, 2018). Hidrocarburi au fost în mod tradițional substraturile preferate pentru fabricarea biosurfactanților și bioemulgatorilor. Se presupune că utilizarea substraturilor hidrofobe poate determina sinteza biosurfactanților, făcând substraturile hidrofobe mai accesibile celulei microbiene generatoare. Se crede că utilizarea substraturilor hidrofobe provoacă sinteza biosurfactanților, făcând substraturile hidrofobe mai accesibile celulei microbiene producătoare. Pe de altă parte, au fost utilizate substraturi solubile în apă (Campos et al., 2013). Deoarece fermentațiile monofazice sunt mai simple decât fermentațiile bifazice, ele sunt mai puțin costisitoare și sunt favorizate ca substrat față de hidrocarburi. În plus, substraturile care conțin hidrocarburi nu sunt adecvate pentru o gamă largă de aplicații, inclusiv cele din industria alimentară, cosmetică și farmaceutică. Grăsimile, uleiurile, glicerolul și carbohidrații sunt exemple de substraturi non-hidrocarburi. Carbohidrații și uleiurile vegetale sunt două dintre cele mai frecvent utilizate substraturi pentru sinteza biosurfactanților (Stoimenova et al., 2009).

Ca o observație generală, există multe utilizări potențiale pentru biosurfactanți datorită biocompatibilității mai bune și biodegradabilității microbiene. Acesta este mai ales cazul când a existat o intervenție semnificativă asupra mediului, cum ar fi decontaminarea zonelor poluate cu petrol, recuperarea terțiară a petrolului, protecția culturilor și industria cosmetică și farmaceutică (Eras-Munos et al., 2018), deoarece biosurfactanții prezintă biocompatibilitate și biodegradabilitate microbiană îmbunătățite. În consecință, nu este surprinzător faptul că au fost efectuate o serie de studii pentru a descoperi sinteza unor astfel de substanțe chimice cu potențiale aplicații în bioremediere, agricultură și industrie (Soare et al, 2018).

Deși producerea de biosurfactanți din fluxurile de deșeuri scade costurile de producție, optimizarea randamentului rămâne un domeniu important de cercetare datorită eterogenității în producerea tulpinilor și a produselor dorite (Mgbechidinma et al., 2022). Prin urmare, procesele proiectate pentru îmbunătățirea deșeurilor la producția de biosurfactanți trebuie dezvoltate în continuare. De exemplu, pentru a crește producția și calitatea produsului biosurfactant, se aplică strategii, inclusiv chimia verde și microorganismele modificate genetic. Chiar dacă pretratarea substraturilor regenerabile facilitează creșterea organismului, trebuie avută grijă pentru a păstra beneficiile nutriționale ale acestor substraturi, deoarece produsul trebuie să fie de calitate și cantitate înaltă pentru a deschide o gamă largă de perspective industriale pentru agenții activi de suprafață de origine microbială. Există încă un potențial mare pentru deșeuri din industria produselor lactate, a grăsimilor animale și a procesării alimentelor (Satpute et al., 2017). Mai mult, un alt aspect de luat în considerare pentru cercetările viitoare este că concentrațiile mari de biosurfactant trebuie utilizate cu prudență datorită activității lor biocide și a potențialei inhibiții enzimatică, care împiedică procesul de remediere și reduce diversitatea microbială.

În ceea ce privește industria alimentară, considerăm că biosurfactanții ar trebui să fie o componentă crucială pentru viitoarea agricultură modernă, deoarece producerea alimentelor necesită o cantitate semnificativă de energie, iar procesele tehnologice generează o cantitate considerabilă de deșeuri. Potențialul de a conecta ecosistemele agroindustriale și de a utiliza procese ecologice ar avea ca rezultat o economie circulară bazată pe bio pentru producția de biosurfactanți. Cu toate acestea, pentru a atinge o astfel de stare dezirabilă, cercetările viitoare ar trebui să abordeze aceste substraturi și procese regenerabile. Pentru a îmbunătăți procesele actuale și a satisface nevoile sistemelor de producție industrială, pot fi dezvoltate configurații experimentale îmbunătățite.

## BIBLIOGRAFIE

---

1. Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1323-1336.
2. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.
3. Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 31(3), 488-494.
4. Arino, S., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (1996). Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1), 162-168.
5. Bérces, A., Fekete, A., Gáspár, S., Gróf, P., Rettberg, P., Horneck, G., & Rontó, G. (1999). Biological UV dosimeters in the assessment of the biological hazard from environmental radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 53(1-3), 36-43.
6. Bhagobaty, R. K., & Malik, A. (2010). Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh, India.
7. Boone, D. R., Liu, Y., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O., & Aldrich, H. C. (1995). *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe (III)-and Mn (IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 441-448.
8. Brovedan, M. A., Marchiaro, P. M., Díaz, M. S., Faccone, D., Corso, A., Pasteran, F., ... & Limansky, A. S. (2021). *Pseudomonas putida* group species as reservoirs of mobilizable Tn402-like class 1 integrons carrying blaVIM-2 metallo-β-lactamase genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 96, 105131.
9. Bujak, T., Wasilewski, T., & Nizioł-Lukaszewska, Z. (2015). Role of macromolecules in the safety of use of body wash cosmetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135, 497-503.
10. Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108.
11. Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108.
12. Cano, R. J., Borucki, M. K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H. N., Poinar Jr, G. O., & Pollard, K. J. (1994). *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis?. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2164-2167.
13. Carpenter, R. J., Hartzell, J. D., Forsberg, J. A., Babel, B. S., & Ganesan, A. (2008). *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *Journal of Infection*, 56(4), 234-240.
14. Chandankere, R., Yao, J., Choi, M. M., Masakorala, K., & Chan, Y. (2013). An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochemical Engineering Journal*, 74, 46-53.
15. Conn, H. J. (1916). Are spore-forming bacteria of any significance in soil under normal conditions?. *Journal of Bacteriology*, 1(2), 187-195.
16. DAGLEY, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. *The bacteria*, 10, 527-556.
17. DeFuria, M. D., & Claridge, C. A. (1976). Aminoglycoside antibiotics produced by the genus *Bacillus*. *Microbiology*, 421-436.
18. Ehinmitola, E. O., Aransiola, E. F., & Adeagbo, O. P. (2018). Comparative study of various carbon sources on rhamnolipid production. *South African journal of chemical engineering*, 26, 42-48.
19. Elshikh, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Biosurfactants: promising bioactive molecules for oral-related health applications. *FEMS Microbiology Letters*, 363(18), fnw213.
20. Eppelmann, K., Doekel, S., & Marahiel, M. A. (2001). Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34824-34831.
21. European Union (2003). Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement).
22. Farn, R. J. (Ed.). (2008). *Chemistry and technology of surfactants*. John Wiley & Sons.
23. Flores, M., Lorenzo, J., & Gómez-Alarcón, G. (1997). Algae and bacteria on historic monuments at Alcalá de Henares, Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(2-4), 241-246.
24. Fox, S. L., & Bala, G. A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource technology*, 75(3), 235-240.

25. Francy, D. S., Thomas, J. M., Raymond, R. L., & Ward, C. H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of industrial microbiology*, 8(4), 237-245.
26. Fredrickson, J. K., & Onstott, T. C. (1996). Microbes deep inside the earth. *Scientific American*, 275(4), 68-73.
27. Fulekar, M. H., & Geetha, M. (2008). Bioremediation of Chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* using scale up technique. *J Appl Biosci*, 12, 657-60.
28. Gardner, J. M., Feldman, A. W., & Zablutowicz, R. M. (1982). Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1335-1342.
29. Germaine, K. J., Liu, X., Cabellos, G. G., Hogan, J. P., Ryan, D., & Dowling, D. N. (2006). Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS microbiology ecology*, 57(2), 302-310.
30. Gilani, R. A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M. F. H., Rehman, S. U., & Chaudhary, H. J. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal of basic microbiology*, 56(2), 105-119.
31. Guo, Y. P., Hu, Y. Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 356-363.
32. Hayes, D. G., Solaiman, D. K., & Ashby, R. D. (2019). *Biobased surfactants: synthesis, properties, and applications*. Elsevier.
33. Hoyer, O. (1998). Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply*, 16(1), 424-429.
34. Hungate, B., Danin, A., Pellerin, N. B., Stemmler, J., Kjellander, P., Adams, J. B., & Staley, J. T. (1987). Characterization of manganese-oxidizing (MnII→ MnIV) bacteria from Negev Desert rock varnish: implications in desert varnish formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(10), 939-943.
35. Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061.
36. Jain, D. K., Lee, H., & Trevors, J. T. (1992). Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of industrial microbiology*, 10(2), 87-93.
37. Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 71(12), 4124-4126.
38. Jiménez-Peñalver, P., Rodríguez, A., Daverey, A., Font, X., & Gea, T. (2019). Use of wastes for sophorolipids production as a transition to circular economy: state of the art and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18(3), 413-435.
39. Jones, D. R., Karunakaran, V., Burges, H. D., & Hacking, A. J. (1991). Ultra-violet-resistant mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of applied bacteriology*, 70(6), 460-463.
40. Karsa, D. R., & Houston, J. (2006). What are surfactants?. *Chemistry and technology of surfactants*, 1.
41. Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H. N. P., Jamal, A., ... & Choi, Y. (2022). Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants—A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102718.
42. Korade, D. L., & Fulekar, M. H. (2009). Rhizosphere remediation of chlorpyrifos in mycorrhizospheric soil using ryegrass. *Journal of hazardous materials*, 172(2-3), 1344-1350.
43. Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1-2), 12-20.
44. Leconte, A., Tournant, L., Muchembled, J., Paucellier, J., Héquet, A., Deracinois, B., ... & Coutte, F. (2022). Assessment of Lipopeptide Mixtures Produced by *Bacillus subtilis* as biocontrol products against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Microorganisms*, 10(9), 1810.
45. MacElwee, C. G., Lee, H., & Trevors, J. T. (1990). Production of extracellular emulsifying agent by *Pseudomonas aeruginosa* UG1. *Journal of industrial microbiology*, 5(1), 25-31.
46. Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?. *Biotechnology letters*, 34(9), 1597-1605.
47. Maya, K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2011). Kinetic analysis reveals bacterial efficacy for biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP. *Process Biochemistry*, 46(11), 2130-2136.
48. Mehdi, S., Dondapati, J. S., & Rahman, P. K. (2011). Influence of nitrogen and phosphorus on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 using glycerol as carbon source. *Biotechnology*, 10(2), 183-189.
49. Mgbechidinma, C. L., Akan, O. D., Zhang, C., Huang, M., Linus, N., Zhu, H., & Wakil, S. M. (2022). Integration of Green Economy Concepts for Sustainable Biosurfactant Production-A Review. *Bioresource Technology*, 128021
50. Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed research international*, 2018.
51. Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.

52. Mulligan, C. N., Sharma, S. K., & Mudhoo, A. (2014). Biosurfactants. *Research Trends and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 34.
53. Nicholson, W. L. (1990). Sporulation, germination, and outgrowth. *Molecular biological methods for Bacillus*.
54. Nicholson, W. L. (2002). Roles of Bacillus endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 410-416.
55. Nicholson, W. L., & Law, J. F. (1999). Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of Bacillus spp. with reference to B. subtilis strain 168. *Journal of Microbiological Methods*, 35(1), 13-21.
56. Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 548-572.
57. Noordman, W. H., & Janssen, D. B. (2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomonas aeruginosa. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4502-4508.
58. Outtrup, H., & Jørgensen, S. T. (2002). The importance of Bacillus species in the production of industrial enzymes. *Applications and systematics of Bacillus and relatives*, 206-218.
59. Patel, R. M., & Desai, A. J. (1997). Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosaGS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, 25(2), 91-94.
60. Persson, A., & Molin, G. (1987). Capacity for biosurfactant production of environmental Pseudomonas and Vibrionaceae growing on carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 439-442.
61. Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(5), 553-563.
62. Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
63. Rosenberg, M., & Rosenberg, E. U. G. E. N. E. (1981). Role of adherence in growth of Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 51-57.
64. Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005-1016.
65. Satpute, S. K., Plaza, G. A., & Banpurka, A. G. (2017). Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. *Management Systems in Production Engineering*
66. Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M., & Sarma, H. (2012). Optimization of environmental factors for improved production of rhamnolipid biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa RS29 on glycerol. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 446-457.
67. Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50(1), 1-17.
68. Siala, A., & Gray, T. R. G. (1974). Growth of Bacillus subtilis and spore germination in soil observed by a fluorescent-antibody technique. *Microbiology*, 81(1), 191-198.
69. Siala, A., Hill, I. R., & Gray, T. R. G. (1974). Populations of spore-forming bacteria in an acid forest soil, with special reference to Bacillus subtilis. *Microbiology*, 81(1), 183-190.
70. Soberón-Chávez, G., & Maier, R. M. (2011). Biosurfactants: a general overview. *Biosurfactants*, 1-11.
71. Soare, M. G., Lakatos, E. S., Ene, N., Malo, N., Popa, O., & Babeanu, N. (2019). The potential applications of Bacillus sp. and Pseudomonas sp. strains with antimicrobial activity against phytopathogens, in waste oils and the bioremediation of hydrocarbons. *Catalysts*, 9(11), 959.
72. Stahly, D. P., & Klein, M. G. (1992). Problems with in vitro production of spores of Bacillus popilliae for use in biological control of the Japanese beetle. *Journal of invertebrate Pathology*, 60(3), 283-291.
73. Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365-12391.
74. Stoimenova, E., Vasileva-Tonkova, E., Sotirova, A., Galabova, D., & Lalchev, Z. (2009). Evaluation of different carbon sources for growth and biosurfactant production by Pseudomonas fluorescens isolated from wastewaters. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(1-2), 96-102.
75. Tadros, T. (2013). Steric stabilization. *Encyclopedia of colloid and interface science*, 1048-1049.
76. Turnbull, P. C., Kramer, J. M., & Melling, J. (1996). Bacillus. *Medical microbiology*.
77. van Veen, J. A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 121-135.
78. Vieira, I. M. M., Santos, B. L. P., Ruzene, D. S., & Silva, D. P. (2021). An overview of current research and developments in biosurfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 1-18.
79. Vijayalakshmi, P., & Usha, M. S. (2012). Degradation of chlorpyrifos by free cells and calcium-alginate immobilized cells of Pseudomonas putida. *Advances in Applied Science Research*, 3(5), 2796-2800.
80. Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., & Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806), 897-900.

81. Yang, S., Huang, H., Zhang, R., Huang, X., Li, S., & Yuan, Z. (2001). Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, *21*(1), 60-64.
82. Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, *12*, 614058.