



Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons et valorisation dans la lutte contre les pollutions marines

Mélanie Chotard

► To cite this version:

Mélanie Chotard. Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons et valorisation dans la lutte contre les pollutions marines. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0044 . tel-03907321

HAL Id: tel-03907321

<https://theses.hal.science/tel-03907321>

Submitted on 20 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *Microbiologie*

Par
Mélanie CHOTARD

Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons et valorisation dans la lutte contre les pollutions marines

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 9 juin 2022

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (UR 3882)

Rapporteurs avant soutenance :

Florence MATHIEU
Robert DURAN

Professeur des Universités, Laboratoire de Génie Chimique, LGC UMR5503, INP/ENSAT, Toulouse
Professeur des Universités, IPREM, Pôle Chimie et Microbiologie de l'Environnement, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau

Composition du Jury :

Président :
Marie-Noëlle ROSSO

Directrice de Recherche, INRAE, UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Université Aix-Marseille

Examinateuse :
Marie-Noëlle ROSSO

Directrice de Recherche, INRAE, UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Université Aix-Marseille

Rapporteurs :
Florence MATHIEU

Professeur des Universités, Laboratoire de Génie Chimique, LGC UMR5503, INP/ENSAT, Toulouse

Robert DURAN

Professeur des Universités, IPREM, Pôle Chimie et Microbiologie de l'Environnement, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau

Dir. de thèse :
Jérôme MOUNIER

Professeur des Universités, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UBO, Brest

Encadrants :
Stéphane LE FLOCH

Docteur, Chef du Service Recherche, Centre de Documentation de Recherche et d'Expérimentation sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE), Brest

Marie-Elisabeth LUCCHESI

Maître de Conférences, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UBO, Brest

On ne peut pas simplement intervenir par la force pour changer une chose sans en changer bien d'autres.

– Rachel Carson

Cette thèse a été financée par le CEDRE et Brest Métropole, en collaboration avec le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM).



Remerciements

Je remercie dans un premier temps les membres du jury, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce projet de thèse n'aurait pas pu voir le jour sans les financements octroyés par Brest Métropole et le CEDRE, que je tiens à remercier en premier lieu chaleureusement.

Je tiens à remercier plus directement MM. Stéphane Doll, Christophe Logette et Arnaud Guéna, respectivement ancien directeur, directeur et directeur adjoint du CEDRE, ainsi que le Pr. Emmanuel Coton, directeur du LUBEM, de m'avoir permis de réaliser cette thèse entre les deux structures. Emmanuel, je tiens à vous remercier plus personnellement pour votre encouragement et votre prévenance à l'égard des doctorants.

Je remercie le Pr. Jérôme Mounier, mon directeur de thèse, d'avoir été d'un soutien sans faille, d'avoir été présent du début à la fin, tant sur les validations de protocoles, les mises en pratique que sur les aspects rédactionnels. Merci pour tes conseils avisés, ton partage d'expérience et ton savoir. Je suis sincèrement reconnaissante d'avoir pu réaliser cette thèse sous ta direction.

Je tiens ensuite à remercier le Dr. Stéphane Le Floch, mon encadrant basé au CEDRE, d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de travailler sereinement, merci également de m'avoir fait confiance pour certains défis de dernière minute, qui ont enrichi cette thèse.

Merci au Dr. Marie-Elisabeth Lucchesi, mon encadrante basée au LUBEM. Merci pour ton soutien, ta confiance et tes valeurs humaines. Je suis reconnaissante d'avoir pu travailler avec toi et d'avoir pu bénéficier de ton regard de chimiste, qui a su m'éclairer.

Merci à vous trois de m'avoir choisie lors du recrutement, de m'avoir soutenue et fait confiance.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon comité de suivi individuel, Pr. Reine Nehmé, Pr. Joëlle Dupont et Dr. Jean Guezennec. Merci pour vos conseils, votre écoute et votre gentillesse.

Merci au Dr. Florian Lelchat, qui travaillait au CEDRE lorsque j'ai débuté ma thèse, et qui m'a accompagnée lors des prélèvements et lors de mes venues au CEDRE en 1^{ère} année.

Merci aux membres du CEDRE, pour votre accueil et votre prévenance. J'ai une pensée particulière pour Ronan, William, Corinne, Laura et Pascale.

Merci au personnel ESIAB, Anne-Cécile, Adeline, Cathy, Dominique, MHT, Sophie, pour votre sympathie et votre bonne humeur.

Ensuite, merci aux membres du LUBEM, Gaétan B., Gaétan LF, Patrice, Adeline, Franck, Valérie, Karim, Amélie, Nolwenn, Jean-Luc, et Monika. Monika, merci beaucoup de m'avoir formée aux bases de la LCMS, d'avoir pris ce temps qui m'a enrichie de nouvelles compétences. Merci d'avoir partagé tes connaissances et ton expérience avec moi.

Je souhaite également adresser un grand merci à Laurence. Merci pour ton aide précieuse, d'avoir pris du temps pour partager ton savoir en bioch et ta bonne humeur. Merci pour ton soutien, et ta bienveillance, merci d'avoir su être là et de m'avoir encadrée à titre officieux.

J'ai une pensée également pour Amandine, Gwennina, Océane, Charlotte, Romain et Maïwenn, je suis ravie d'avoir fait votre connaissance en cette dernière année, et vous souhaite une bonne continuation.

Marielle, un grand merci pour ta bienveillance, et ta présence. Merci pour ton aide inestimable durant ces trois années. Merci également à Michèle Kerleroux et Isabelle Baumgarten.

Mes plus sincères remerciements vont en outre à Audrey, Christelle, Christophe, Estelle, Elisabeth et Sylvie. Merci à vous tous d'avoir été, pour certains, et d'être, pour les autres, toujours présents, de nous partager vos connaissances, qui dans bien des cas nous sauvent la mise. Merci Stella de veiller sur nous et de faire en sorte que le labo tourne au mieux. Merci Christophe pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton soutien. Merci Elisabeth de m'avoir facilité nombreuses manips, merci en particulier de m'avoir fait confiance pour les nombreux allers-retours avec les ampoules à décanter de TP. Et merci Sylvie pour ton aide et tous ces indispensables litres de milieux de culture.

Je remercie également Fabienne Le Grand de la plateforme LIPIDOCEAN, et j'ai une pensée particulière pour Nelly Kervarec, avec qui il fut un réel plaisir de travailler. Un immense merci Nelly pour ton aide, ton optimisme à toute épreuve et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier les stagiaires avec qui j'ai pu travailler : Lydia et Charlène, vous avez été de réels atouts à ce projet et avez permis de vraies avancées, je vous en remercie.

Je remercie les doctorants et stagiaires italiens que j'ai pu rencontrer et avec qui il fut agréable d'échanger et de boire des coups : merci à Azzura, Gorgia, Irene et Marco. Marco, gracie mille pour tes encouragements et ta joie de vivre qui m'a fait le plus grand bien en cette fin de thèse. T'es un bimbo che pesto.

J'ai une pensée pour l'équipe LABS, en particulier Steven, mon président, merci à toi, d'avoir su nous réunir autour de ce projet, et j'ai aussi une pensée pour Fanny.

Merci en outre aux doctorants du LUBEM, ceux sur qui nous pouvons compter. Merci à Guillaume et Marine, d'avoir partagé mes premières années (lune de miel) de thèse, de m'avoir apporté votre aide, et d'avoir été de réelles sources de conseils. Merci aux autres doctorants que j'ai côtoyés durant ces 3 années, et aux derniers arrivés à qui je souhaite force

et courage : Nicolas, Damien, Toan. Nico et Damien, duo de choc, je vous remercie pour votre zinzinitude constante et votre humour, bien à vous.

Quant aux plus anciens,

Bastien, en plus d'être ce réel patriote sarthois, tu as été un collègue d'exception, que je tiens à remercier pour ta sempiternelle joie de vivre, je n'oublierai pas toutes ces pauses café, tous ces scotchs placés sous les souris, et toutes ces bonnes refs cinématographiques qui ont fait notre quotidien lorsque tu étais à Plouzané.

Vincent, mon lapin, un grand merci à toi d'avoir été ce super collègue de confiance, avec qui décompresser, avoir des conversations interminables, passer des soirées inoubliables et d'avoir été celui qui pouvait me confirmer sans aucun doute que non, il n'y a pas de conta sur cette boîte.

Océane, mon poussin, merci d'avoir été là du début à la fin (presque), merci pour tous ces moments de complicité, d'avoir été mon Dupont, mon Tac. Je garderai en mémoire nos pérégrinations à Rennes, entre bières et pesto, ta lubie pour les minions, tes pffrrr, tes « FRISSONS », et nos fous rires.

Je vous souhaite à tous les 3 le meilleur pour l'avenir, BB que ce post-doc payé 3000€ tu trouves, VV, que l'agrégation et la pédagogie soient avec toi, et OC, que ton épanouissement soit total.

Aux petits nouveaux, plus si nouveaux,

Adrien, Aurélie, Ewen, Marie, Marine et Nolwenn, avec qui j'ai passé cette dernière année et demie, merci pour votre présence, votre bienveillance, votre gentillesse, je vous souhaite à tous le meilleur. Adrien et Nolwenn, je suis ravie d'avoir partagé le bureau 117 avec vous, et je vous souhaite une belle réussite dans vos thèses.

Aurélie et Ewen merci à vous d'être ces collèguamis sur qui on peut compter à tout moment, à l'écoute et bienveillants. Marie, merci d'avoir été une collègue en or, merci pour ton aide inestimable, en extraction comme en analyse métabar, tu auras indubitablement rendu cette tâche agréable (et c'était pas gagné). Je te remercie aussi d'être une amie d'exception, ton soutien, ton écoute précieuse et ta confiance m'ont été d'un réel réconfort.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, ma belle-famille et mes amis qui ont cru en moi.

Merci à mes parents de m'avoir permis de faire des études.

Merci à Angel, Béren, Jérem et Faustine pour votre soutien, et votre présence.

Un grand merci à Aurélie, mon petit Bretzel, qui m'a soutenue depuis l'autre bout de la France.

En dernier lieu, je tiens à remercier (ma) Marie, c'est à toi que je dois cette thèse, tu as su me soutenir, et m'épauler comme personne. Tu as été ce pilier qui m'a donné la force d'aller au bout et qui a rendu chacun de ces jours plus beaux et plus faciles à supporter. Ces quelques lignes ne suffiront pas à t'exprimer toute la reconnaissance et tout l'amour que j'ai pour toi. J'ai hâte de poursuivre mon chemin, à tes côtés.

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été mené dans le cadre du projet BIFACEMAR ayant pour objectif central de mettre en avant la production de bio-tensioactifs chez des champignons.

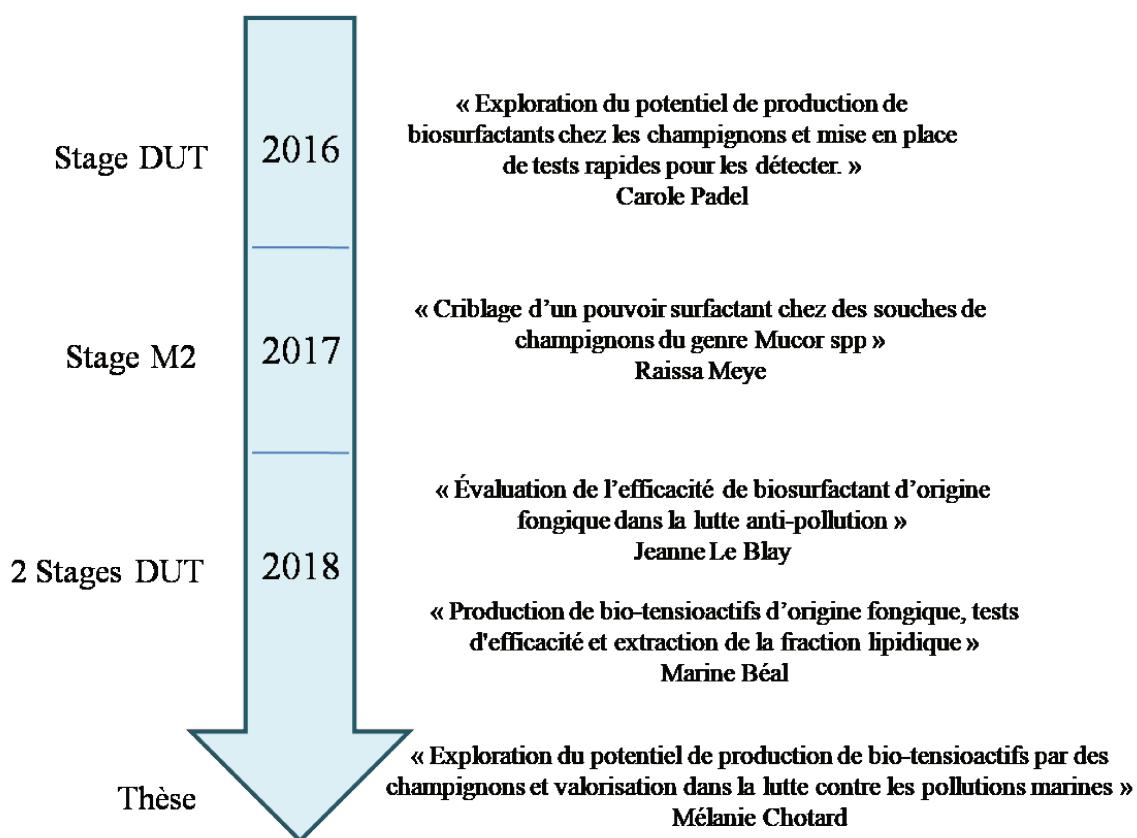


Figure 1 – Travaux conduits dans le cadre du projet BIFACEMAR

Cette thèse a fait suite à plusieurs stages ayant abordé la production de bio-tensioactifs chez des champignons et leur criblage (Figure 1).

Ce manuscrit fait état de l'ensemble des résultats obtenus via des articles publiés, soumis et en préparation. Il se divise en quatre parties.

La première partie de ce manuscrit est composée d'une introduction générale, présentant le contexte bibliographique, plus particulièrement le pétrole, ses origines et sa composition, les causes et les enjeux des déversements pétroliers, les outils de lutte contre ces pollutions, les dispersants, les tensioactifs et enfin les bio-tensioactifs. Cette première partie est conclue par les questions scientifiques et les objectifs de la thèse.

La deuxième partie se compose de l'ensemble des résultats obtenus au cours de la thèse, et se divise en trois chapitres, représentant les trois grandes études réalisées pendant la thèse. Le premier chapitre consiste en l'étude conduite sur des souches de collection appartenant au phylum des Mucoromycota et leur capacité à produire des bio-tensioactifs.

Le second chapitre présente l'étude de la diversité et du potentiel de production de bio-tensioactifs des champignons issus d'environnements contaminés aux hydrocarbures.

Le troisième chapitre présente l'optimisation, la montée en échelle de la production de bio-tensioactifs par *Trichoderma citrinoviride* UBOCC-A-121088, souche sélectionnée lors de l'étude précédente car étant le meilleur candidat, mais aussi la caractérisation de son activité surfactante et une identification préliminaire des molécules actives.

La troisième partie présente une discussion générale ainsi que les perspectives de la thèse.

La quatrième partie fait état des valorisations réalisées pendant la thèse, incluant les conférences orales et posters présentés lors de congrès, ainsi que les publications réalisées.

Sommaire

<i>Remerciements</i>	- 6 -
<i>Avant-Propos</i>	- 10 -
INTRODUCTION GÉNÉRALE	- 18 -
I – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	- 20 -
II – PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE	- 57 -
RÉSULTATS	- 60 -
CHAPITRE I : Production de bio-tensioactifs par des champignons du phylum des Mucoromycota..	- 62 -
I- Résumé des travaux	- 62 -
II- Article publié dans <i>Applied Microbiology</i>	- 64 -
Figures supplémentaires	- 78 -
CHAPITRE II : Diversité fongique et champignons producteurs de bio-tensioactifs dans des environnements contaminés aux hydrocarbures.....	- 82 -
I- Résumé des travaux	- 82 -
II- Article soumis à <i>Journal of Applied Microbiology</i>	- 84 -
Figures supplémentaires	- 108 -
CHAPITRE III : Optimisation, montée en échelle et caractérisation chimique préliminaire de bio- tensioactifs produits par <i>Trichoderma citrinoviride</i>	- 124 -
I- Résumé des travaux	- 124 -
II- Article en préparation	- 126 -
DISCUSSION GÉNÉRALE	- 156 -
VALORISATION	- 164 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 172 -

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 - Prémices du projet BIFACEMAR</i>	- 10 -
<i>Figure 2 - Production de pétrole entre 1900 et 2020 (1 TWh =588235 barils ; 1 baril =159 L).....</i>	- 21 -
<i>Figure 3 – Carte géologique simplifiée présentant les provinces pétrolières (Biteau & Baudin, 2017) ..</i>	- 22 -
<i>Figure 4 - Hydrocarbures présents dans le pétrole (d'après Kanan, 2012)</i>	- 23 -
<i>Figure 5 - Composés non-hydrocarbonés du pétrole (d'après Kanan, 2012)</i>	- 24 -
<i>Figure 6 - Tailles et trafics maritimes des pétroliers (©EIA)</i>	- 25 -
<i>Figure 7 - Exemples de déversements pétroliers entre 1967 et 2010 (navire/plateforme, quantité de pétrole déversée et lieu)</i>	- 26 -
<i>Figure 8 - Localisation des plus importants déversements de pétroliers depuis 1967 (ITOPF, 2022).....</i>	- 26 -
<i>Figure 9 - Devenir d'une nappe de pétrole (Cedre, 2006).....</i>	- 30 -
<i>Figure 10 - Voies de dégradation microbiennes (Widdel & Rabus, 2001)</i>	- 31 -
<i>Figure 11 - Méthodes de lutte contre une pollution aux hydrocarbures en mer, d'après Bertrand et al., 2015</i>	- 35 -
<i>Figure 12 - Amélioration de la biodégradation par utilisation de tensioactifs, d'après Lawniczak et al., 2020.....</i>	- 40 -
<i>Figure 13 - Pays utilisant les dispersants en réponse aux déversements pétroliers, d'après Chapman et al. (2007).....</i>	- 42 -
<i>Figure 14 - Composition d'une molécule tensioactive.....</i>	- 44 -
<i>Figure 15 - Structures et applications des hydrophobines, d'après Bayry et al., 2012</i>	- 56 -
<i>Figure 16 - Schéma graphique simplifié des expérimentations menées dans cette étude</i>	- 62 -

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 - Exemples de microorganismes capables de biodégrader certains hydrocarbures</i>	<i>- 32 -</i>
<i>Tableau 2 - Exemple de consortia microbiens utilisés en bioaugmentation pour la dégradation de polluants</i>	<i>- 37 -</i>
<i>Tableau 3 - Dégradation d'hydrocarbures pétroliers utilisant la double approche bioaugmentation/biostimulation</i>	<i>- 39 -</i>
<i>Tableau 4 - Applications des tensioactifs selon leur HLB (d'après Larpent, 1995)</i>	<i>- 46 -</i>
<i>Tableau 5 - Producteurs et structures des glycolipides</i>	<i>- 48 -</i>
<i>Tableau 6 - Exemples de lipopeptides et leurs producteurs</i>	<i>- 50 -</i>
<i>Tableau 7 - Présence de biotensioactifs observée chez des champignons filamentueux ou des levures</i>	<i>- 53 -</i>

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ASV : Variant de Séquence d'Amplicon

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CEDRE : Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux

CMC : Concentration Micellaire Critique

E24 : indice d'émulsion après 24 h

GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HLB : balance hydrophile-lipophile

IBSAM : Institut Brestois Santé Agro-Matière

ITOPF : International Owners Pollution Federation

LC50 : Concentration Létale causant la mort de 50% des organismes observés

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

mN/m : millinewton/metre : unité de tension de surface

OST : Oil Spreading Test

PMT : Parafilm M Test

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

TWh : TéraWatt heure

UBO : Université de Bretagne Occidentale

UBOCC : Collection de culture de l'UBO

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le pétrole : origines et composition

Le premier puits pétrolier, où le pétrole est récupéré par forage, voit le jour en 1859 en Pennsylvanie. Dès 1862, 3 millions de barils sont produits aux Etats-Unis. En 2015, la production annuelle mondiale atteint 32,85 milliards de barils (Biteau & Baudin, 2017).

Au cours du XX^{ème} siècle, la demande en pétrole n'a cessé de croître avec l'apparition d'une société de consommation de plus en plus frénétique à compter de la première guerre mondiale. Ainsi, dès 1905, l'industrie automobile, sous l'impulsion d'Henry Ford, a commencé la production en masse de véhicules fonctionnant aux carburants liquides qui passent alors de zéro à 29 millions dans le monde au cours des années 30, puis à 603 millions en 2004 (Vassiliou, 2009). Dès les années 30, la chimie élabore également des procédés de polymérisation afin d'obtenir du PVC et du nylon. Le développement de la pétrochimie permet l'utilisation du naphta (coupe pétrolière plus lourde que l'essence destinée aux voitures) qui conduira à la synthèse par vapocraquage de polymères tels que le polyéthylène ou le polypropylène utilisés notamment pour la fabrication d'emballages plastiques (Maugeri, 2006). L'utilisation des matières plastiques a connu un essor considérable avec une production passant de 2 millions de tonnes métriques en 1950 à 348 millions en 2017 (Geyer *et al.*, 2017; Gibb, 2019). Cette hausse considérable permet en partie d'expliquer l'augmentation de la production de pétrole entre 1900 et les années 2000, avec les Etats-Unis, et l'Arabie Saoudite comme pays les plus producteurs de pétrole (Figure 2). Elle s'explique également par la forte croissance démographique, mais aussi par la révolution verte où la consommation d'intrants, dépendants du pétrole, a connu une hausse phénoménale. A titre d'exemple, la consommation d'engrais a été multipliée par 2 entre 1960 et 1980, passant de 25 millions à 50 millions de tonnes (Taylor, 1994). La demande ainsi que les capacités de production n'ont dès lors cessé d'augmenter.

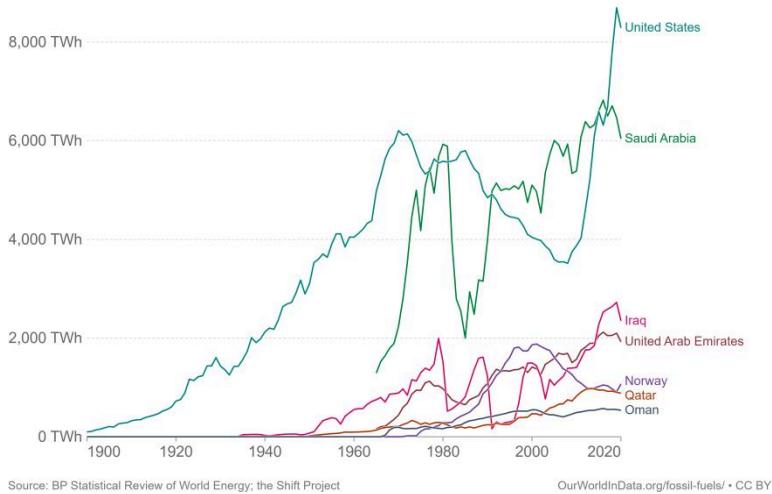


Figure 2 - Production de pétrole entre 1900 et 2020 (1 TWh =588235 barils ; 1 baril =159 L)

1.1. Origine et formation du pétrole

Le pétrole brut est une huile minérale résultant de la transformation de matière organique (animale et végétale) en roche liquide sous des pressions et températures élevées et à l'abri de l'oxygène.

Sa formation initiale remonte au Paléozoïque et plus particulièrement entre l'Ordovicien (-488 Ma) et le Permien (-299 Ma) (Stevens, 1956). A cette époque, de nombreux bassins sédimentaires se forment et commencent à stocker de la matière organique (carbone, hydrogène, oxygène, azote). Cette dernière permet la formation d'hydrocarbures sous l'effet de la température et de la pression. A un kilomètre sous terre, avec une température avoisinant les 60°C et une pression de 250 bars, la matière organique piégée dans les roches sédimentaires forme du kérogène (matrice constituée d'eau, de CO₂, d'hydrogène et de carbone).

Lorsque la température et la pression augmentent encore avec l'enfouissement, entre 2.000 et 3.800 mètres, les roches-mères (roches sédimentaires riches en matière organique) entrent dans ce que l'on appelle « la fenêtre à huile ». Les liaisons chimiques du kérogène se brisent et les atomes de carbone et d'hydrogène se recombinent pour former du pétrole. Selon la composition initiale du kérogène et les conditions thermodynamiques de l'environnement, cela se produit à une température comprise entre 60 et 120 °C (Pimsee, 2014).

Le pétrole se retrouve donc au niveau des bassins sédimentaires puisque les roches présentes dans ces bassins forment à la fois la roche mère et le réservoir du pétrole (Figure 3). Il est estimé que ces bassins sédimentaires abritent 99% des réserves mondiales de pétrole (Baudin, 2022).

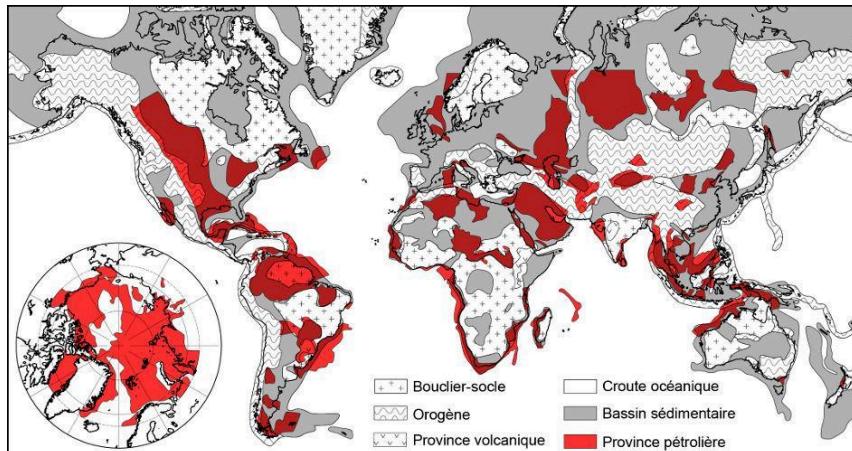


Figure 3 – Carte géologique simplifiée présentant les provinces pétrolières (Biteau & Baudin, 2017)

1.2. Composants du pétrole

Chaque pétrole possède des signatures, des caractéristiques physico-chimiques uniques, parfois même au sein d'un même puits. Leurs compositions peuvent ainsi largement varier d'un point de vue qualitatif et quantitatif, de par les hydrocarbures les constituant ; lesquels résultent de l'histoire géologique du lieu de forage (Fingas, 2016; Tissot & Welte, 1984; Wauquier, 1995). Le pétrole est composé en majorité d'hydrocarbures formant des fractions différentes en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, ainsi que d'autres composés non-hydrocarbonés tels que des résines, des asphaltènes, des composés organiques hétéroatomiques de soufre, d'oxygène, d'azote, ou encore des composés organométalliques à base de nickel ou de vanadium (Wauquier, 1995).

1.2.1. Hydrocarbures

Les hydrocarbures constituant le pétrole peuvent être divisés en 2 groupes principaux : les hydrocarbures saturés, et les hydrocarbures aromatiques. Ils représentent entre 80 et 95% de la masse d'un pétrole brut (Kanan, 2012).

- Les *hydrocarbures saturés* sont la forme la plus simple des hydrocarbures, ils sont formés d'une chaîne aliphatique et sont dits « saturés » en hydrogène. Ils regroupent ainsi les alcanes, plus légers ($< C_{18}$), les cires (ou paraffines), et les hydrocarbures saturés plus lourds ($> C_{18}$) (Fingas, 2016).

Ces alcanes peuvent se trouver sous forme de chaînes carbonées simples (*n*-alcanes), formés des cycles (cycloalcanes), ou se ramifier (alcanes ramifiés) (Figure 3).

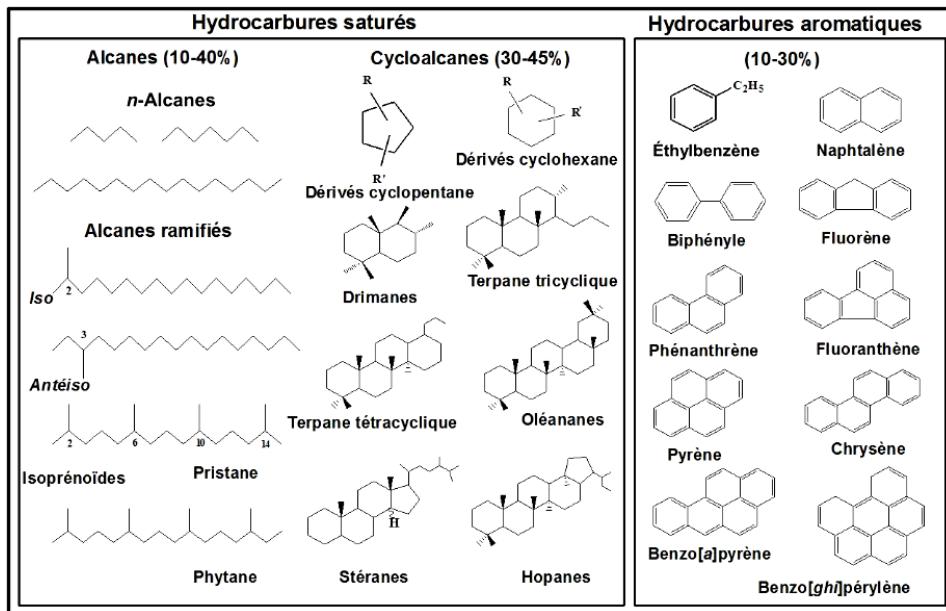


Figure 4 - Hydrocarbures présents dans le pétrole (d'après Kanan, 2012)

- Les *hydrocarbures aromatiques* sont des composés cycliques tels que les BTEX (benzène, toluène, ethylbenzène, xylène) ou encore les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) (Figure 4)(Fingas, 2016). Ces hydrocarbures possèdent une toxicité élevée sur les êtres vivants et particulièrement les HAP, classés comme cancérogènes. Ce sont des molécules relativement stables (les HAP linéaires étant moins stables). Ils sont en outre peu hydrosolubles, à l'exception du naphtalène (Kanan, 2012).

1.2.2. Autres composés du pétrole

Le pétrole abrite d'autres composés dits « non-hydrocarbonés » (Figure 5). Cette catégorie de composés regroupe en majorité des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène, et parfois des traces de métal tel que le fer ou le nickel. Certains de ces composés sont de faibles poids moléculaires (< 100 Da) tandis que d'autres se distinguent par un haut poids moléculaire (400-1500 Da), comme c'est le cas pour les résines et les asphaltènes (Tissot & Welte, 1984). Les résines sont des molécules polaires, constituées d'hétéroatomes (N, S, O) substituant des atomes de carbone dans des hydrocarbures aromatiques. A l'inverse des cires et des aromatiques, elles sont plus solubles dans des solvants polaires (Wauquier, 1995).

Les asphaltènes regroupent un grand nombre de composés organiques qui accroissent la viscosité et la densité du pétrole (Zhu *et al.*, 2022). Ce sont des molécules complexes

contenant également des hétéroatomes (N, S et O) et pour certaines, des traces de métaux tels que le vanadium (Boukherissa, 2008; Terrisse, 2014).

Les porphyrines sont quant à elles des macrocycles aromatiques, présentes sous forme de complexes de vanadium ou de nickel. Elles permettent notamment d'attester de l'origine biologique du pétrole étant donné que ces complexes sont issus de la dégradation des chlorophylles (Tissot & Welte, 1984).

Composés N, S, O							Asphaltènes et résines
Pyrole	Quinoline	R-SH Mercaptans	Thiophène	R-OH Alcools	Furane		
		R-S-R Sulfures		R-CHO Aldéhydes			
		R-S-S-R Disulfures		R-COOH Acides			
						Métaux (Ni, V, U, Fe...)	

Figure 5 - Composés non-hydrocarbonés du pétrole (d'après Kanan, 2012)

2. Du trafic aux fortunes

2.1.Trafic maritime : pétroliers et routes maritimes

Le trafic maritime a quadruplé entre 1970 et 2020, passant de 2,5 milliards de tonnes chargées à 10,7 milliards (UNCTAD, 2021). Les routes maritimes sont actuellement le théâtre de plus de 90% des échanges mondiaux. La principale raison du monopole du transport maritime est son faible coût (Bahé, 2008). Le pétrole représentait 16.1% des produits transportés en 2020 et était en majorité à destination des puissances économiques (UNCTAD, 2021).

Les routes maritimes sont très nombreuses et les flux sont d'autant plus importants vers la Chine, l'Inde et le Brésil. Ces flux passent en outre par les détroits de Singapour, de Gibraltar, par les canaux de Panama et de Suez mais également par certaines régions telles que la Manche et la Méditerranée où les densités sont particulièrement élevées (Bahé, 2008).

Il est estimé que, chaque jour, 8 pétroliers transitent dans la Manche, outre les chimiquiers et porte-conteneurs. Cette zone représente 20% du trafic maritime mondial, et en fait une des zones les plus actives au monde (Bahé, 2008). La Méditerranée concentre 25% du trafic maritime mondial et 30% du trafic d'hydrocarbures, principalement du Moyen Orient et de l'Afrique du nord vers le sud de l'Europe.

Les pétroliers sont classés par taille et selon les distances à effectuer (Figure 6). Ainsi, les *supertankers*, ULCC (*Ultra Large Crude Carrier*) et VLCC (*Very Large Crude Carrier*) peuvent transporter plus de 2 millions de barils et mesurer plus de 400 m de long. Ces navires

sont donc utilisés pour le transport longue distance mais ne sont pas en capacité de passer certains détroits ou canaux, à l'instar des pétroliers de type "Aframax", "Panamax" ou "Suezmax". En 2020, les pétroliers représentaient 17.3% des bateaux en circulation, soit environ 17000 navires (UNCTAD, 2020).

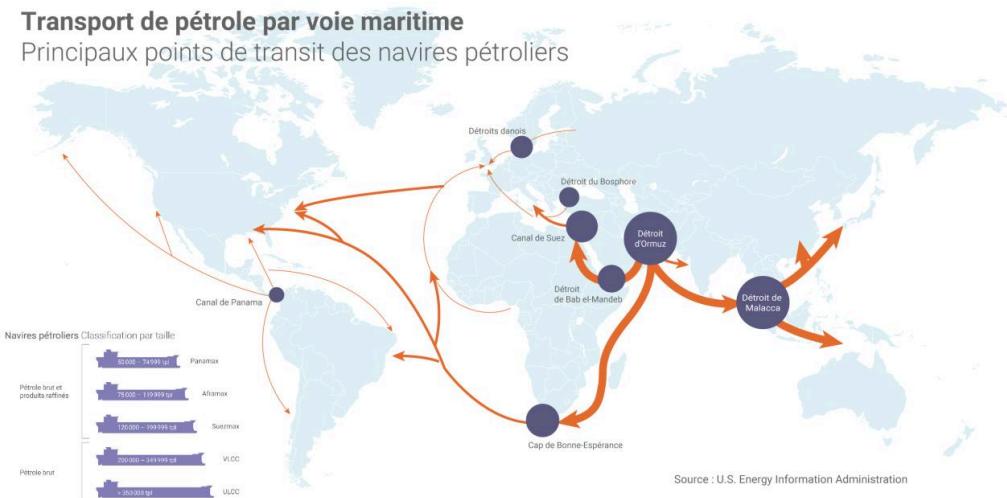


Figure 6 - Tailles et trafics maritimes des pétroliers (©EIA)

2.2. Accidents pétroliers et marées noires

Le trafic maritime est une des principales causes de pollutions pétrolières en mer, représentant un tiers des déversements d'hydrocarbures dans les océans (Albakjaji, 2010). Lorsque ce déversement fait suite à une collision ou un naufrage, on parlera de pollution accidentelle et de pollution opérationnelle pour les navires opérant des déballastages ou dégazages.

Ces accidents ont des conséquences non négligeables sur l'environnement marin, la biodiversité et les écosystèmes, ainsi que sur la santé humaine (Stauffert, 2011). Lorsque des marées noires se produisent, le temps de réhabilitation est estimé entre une dizaine d'années à plusieurs décennies, en fonction du milieu impacté.

En 1967, le *Torrey Canyon* s'échoue au sud-ouest du Royaume-Uni, chargé de 121 000 tonnes de pétrole. Près de 119 000 tonnes sont déversées le long des côtes bretonnes (Bahé, 2008). Onze ans plus tard, l'*Amoco Cadiz*, pétrolier chargé de 223 000 tonnes s'échoue à Portsall (Bretagne). La totalité de la cargaison est déversée le long du littoral breton.

Ces accidents sont suivis par une série de déversements pétroliers, provoqués, comme lors de la guerre du Golfe en 1991 dans le Golfe Persique, ou accidentels, comme lors des

échouements de l'*Exxon Valdez* en 1989 au large de l'Alaska, de l'*Erika* en 1999 au large de la Bretagne, ou encore du *Prestige* en 2002 au large de l'Espagne (Figure 7).

Il est à noter que parmi les 24 plus grands déversements, 50% ont eu lieu en Europe (Little *et al.*, 2021)(Figure 8).

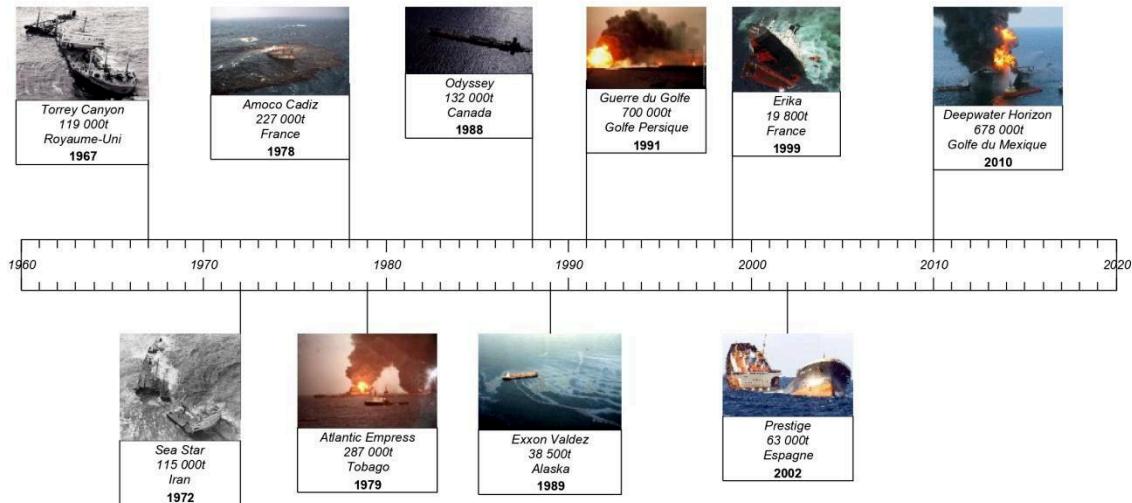


Figure 7 - Exemples de déversements pétroliers entre 1967 et 2010 (navire/plateforme, quantité de pétrole déversée et lieu)



Figure 8 - Localisation des plus importants déversements de pétroliers depuis 1967 (ITOPF, 2022)

2.3.Causes des accidents et réglementations

Les causes imputées à ces accidents peuvent être diverses. Ainsi, il est estimé, d'après les assurances, que 80% des accidents de pétroliers, conduisant à des déversements

d'hydrocarbures, sont dus à des erreurs humaines (par exemple à cause d'équipages mal formés ou de mauvaises manœuvres) (Cedre, 2006).

D'après le rapport de l'ITOPF¹ de 2021, les déversements dus aux pétroliers entre 1970 et 2021 étaient dus à 6 causes majeures. D'une part, les déversements compris entre 7 et 700 tonnes d'hydrocarbures, étaient liés à 26% aux collisions, 20% aux échouements, 15% aux défauts d'équipements, 7% à un défaut de la coque, 4% aux incendies ou explosions, 13% à d'autres raisons (erreurs humaines ou intempéries) et enfin 15% à des raisons inconnues.

D'autre part, pour les déversements supérieurs à 700 tonnes d'hydrocarbures, les causes établies représentent à 32%, les échouements, 30% les collisions, 13% un défaut de coque, 11% des explosions ou incendies, 4% des défauts d'équipements, 7% d'autres raisons (erreurs humaines ou intempéries) et enfin 3%, des raisons inconnues (ITOPF, 2022).

D'après ce même rapport, il est établi que moins de 10% des déversements de plus de 7 tonnes d'hydrocarbures sont causés par des incendies ou explosions mais qu'ils sont responsables de 26% de la quantité de pétrole déversée au même titre que les collisions et les échouements qui eux représentent respectivement, 27% et 23% du nombre de déversements.

Ces causes peuvent être aggravées par divers facteurs tels que l'âge du navire, sa taille, son usure, ou encore le pavillon qu'il arbore. En effet, il est estimé que 40 % des naufrages sont induits par des navires âgés de plus de quinze ans (Edorh, 2008). En 2018, l'âge moyen des pétroliers en circulation était de 19,06 ans, avec 14,97% des navires ayant entre 0 et 4 ans, 21,89% ayant entre 5 et 9 ans, 25,5% entre 10 et 19 ans et 37,64% des navires ayant plus de 20 ans (UNCTAD, 2018). En outre, il apparaît également que les plus petits navires sont moins confrontés aux problèmes que ceux de gros tonnage (Edorh, 2008).

On retrouve parmi les pavillons arborés par les navires, terme qualifiant l'immatriculation du navire, ceux dits de « complaisance ». Il s'agit de navires affrétés par un pays mais immatriculés dans un autre pays, la plupart du temps dont les normes maritimes sont moins contraignantes (Konan, 2018).

En 2019, les 5 principaux pays propriétaires de pétroliers étaient la Grèce, Singapour, la Chine, le Japon et Hong Kong, constituant 47% de la valeur commerciale pétrolière mondiale, tandis que les 5 principaux pays pavillonnaires de pétroliers étaient les Iles Marshall, le Libéria, le Panama, Singapour et Hong Kong, représentant 55% de la valeur commerciale pétrolière mondiale (UNCTAD, 2019).

¹ L'ITOPF (*International Tanker Owners Pollution Federation*) est un organisme promulguant des réponses efficaces lors de déversements de pétrole ou de produits chimiques en mer.

Ces navires bénéficient donc d'avantages car ils sont soumis aux réglementations plus laxistes des pays du pavillon qu'ils arborent (salaires et formations des équipages, normes de sécurité). En effet, de nombreux accidents ont été causés par des navires battant pavillons de complaisance tels que l'*Exxon Valdez* (propriété américaine, immatriculé aux Iles Marshall), l'*Amoco Cadiz* (propriété américaine, immatriculé au Libéria), l'*Erika* (propriété française, immatriculé à Malte), le *Prestige* (propriété grecque, immatriculé aux Bahamas) ou encore le *Torrey Canyon* (propriété américaine, immatriculé au Libéria).

Aussi, afin de prévenir les accidents, il est indispensable de prendre en compte ces nombreuses causes et de réglementer les pollutions. Chaque accident a conduit à de nouvelles règles, ainsi suite au naufrage du *Titanic* (1912), le traité SOLAS (*safety of life at sea*) est ratifié, il conduira à la création de la première organisation maritime mondiale, l'Organisation Maritime Internationale (OMI) (renommée en 1948). Suite à l'échouement de l'*Exxon Valdez* (1989) les Etats-Unis obligent l'utilisation d'une double-coque pour les pétroliers. L'*Erika*, qui s'échoue en 1999 conduit à l'interdiction des pétroliers avec des simples coques. La France quant à elle, élabore le plan POLMAR (Pollution Maritime) en 1971, mais il est appliqué pour la première fois en 1976 avant d'être réformé en 1977 et d'être à nouveau appliqué en 1978 lors de l'échouement de l'*Amoco Cadiz* (Bahé, 2008). Ce plan est un plan d'intervention qui est déclenché lors de pollutions maritimes accidentelles, et permet la coordination du personnel et des moyens de lutte. Cet échouement a également conduit à la création du CEDRE (centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux) en 1979.

Comme rapporté par Little en 2021, le *Torrey Canyon*, l'*Amoco Cadiz* et l'*Exxon Valdez* ont marqué les esprits et ont permis une prise de conscience de la gravité de ces déversements face aux enjeux environnementaux (Little *et al.*, 2021).

3. Outils de lutte pour la dépollution : processus naturels et interventions humaines

Afin de lutter efficacement contre une pollution, il est indispensable de prendre en compte les différents processus intervenant dans l'élimination de la contamination. C'est une interaction de phénomènes physico-chimiques et de processus biologiques qui régit la première phase de dépollution.

3.1. Comportement de la nappe de pétrole

- *Processus physico-chimiques*

Lors d'un déversement de pétrole, plusieurs phénomènes apparaissent (Figure 9). La nappe se formant à la surface va évoluer au mouvement de l'eau, s'étaler et se fragmenter, puis dès les premières heures, les composés volatiles contenus dans le pétrole, tels que les gaz (butane, méthane, propane...) et les solvants (toluène, benzène...) vont s'évaporer dans l'atmosphère. Dans de très rares cas, certains solvants organiques miscibles à l'eau peuvent aussi être dissous dans la colonne d'eau. L'évaporation est le processus ayant le plus d'effets suite à un déversement d'hydrocarbures, où les fractions les plus légères du pétrole peuvent disparaître en quelques heures. Le gazole par exemple peut s'évaporer totalement en 10 heures, dans une eau à 15°C (Fingas, 2016).

En parallèle de l'évaporation, une émulsification peut se produire si le brassage de la nappe est important, le produit résultant est communément appelé « mousse au chocolat » de par son aspect stable, qui n'est dès lors plus dispersible. La nappe peut être en outre soumise au phénomène de photo-oxydation, c'est-à-dire subir des dégradations de chaînes carbonées sous l'intensité de lumière (Cedre, 2006). Les produits de photo-oxydation sont généralement plus polaires ce qui augmente leur dissolution dans l'eau. La part lourde du pétrole peut quant à elle sédimerter et se retrouver dans les fonds marins. La sédimentation est un processus lent et ne concerne qu'une faible proportion des éléments contenus dans le pétrole (sauf si celui-ci est particulièrement riche en composés lourds). Elle entraîne la formation d'agrégats dont la densité élevée empêche la dégradation naturelle (Kanan, 2012).

Enfin, il faut souligner que l'ensemble de ces processus physico-chimiques dépendent de plusieurs facteurs tels que la météorologie, les courants, la température de l'eau, la salinité etc. (Fingas, 2000).

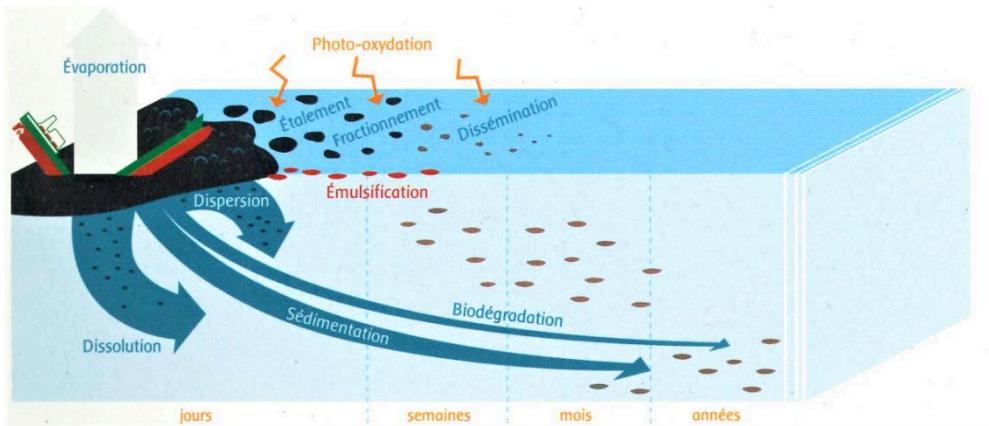


Figure 9 - Devenir d'une nappe de pétrole (Cedre, 2006)

- *Processus biologiques*

Les processus biologiques se divisent en trois phénomènes principaux que sont la bioturbation, la bioaccumulation et la biodégradation.

La *bioturbation* englobe les processus de transports assurés par les organismes benthiques, de la microfaune à la mégafaune, en incluant les invertébrés, les poissons mais aussi les plantes. Ce phénomène affecte les particules, en remaniant et ventilant les sédiments, ce qui va permettre aux particules de se déplacer (Massé, 2014). Le remaniement sédimentaire par la faune bioturbatrice permet la désorption des hydrocarbures et donc leur biodisponibilité dans la colonne d'eau. Ce remaniement permet également l'oxygénation des sédiments, qui favorise quant à elle la biodégradation des hydrocarbures par les organismes hydrocarbonoclastes (Kanan, 2012).

La *bioaccumulation* des hydrocarbures est due aux gouttelettes formées qui vont se dissoudre ou se fixer à d'autres particules, et se retrouver dans les cellules des organismes les absorbant. Par un phénomène d'amplification, ces particules vont remonter les chaînes trophiques et atteindre majoritairement les organismes prédateurs au sommet de ces chaînes (Kanan, 2012).

La *biodégradation* constitue le processus biologique le plus important et est permise par les nombreux micro-organismes (procaryotes et eucaryotes) capables de dégrader les hydrocarbures, qui sont présents dans l'eau et les sédiments, et qui vont tirer bénéfice de ces hydrocarbures en les utilisant comme source de carbone et d'énergie (Kanan, 2012; Van Hamme *et al.*, 2003).

La dégradation des hydrocarbures par ces organismes hydrocarbonoclastes peut se faire en milieu aérobie mais également en milieu anaérobie, en mettant en place différentes voies de

biodégradation (Stauffert, 2011). En milieu anaérobie, les microorganismes dégradeurs vont utiliser le nitrate, le sulfate ou le fer comme accepteur d'électrons, les organismes méthanogènes peuvent eux aussi dégrader les hydrocarbures et les transformer en méthane (Figure 10)(Gray *et al.*, 2010; Widdel *et al.*, 2010; Widdel & Rabus, 2001). Cette biodégradation va toutefois dépendre des facteurs environnementaux telles que la température, l'oxygénation, et la concentration en éléments minéraux (azote, phosphore et fer)(Atlas, 1988; Leahy & Colwell, 1990). Il est nécessaire aussi de prendre en compte l'aspect du pétrole (Das & Chandran, 2011; Koshlaf & Ball, 2017). Typiquement, lorsque le pétrole est émulsionné dans l'eau sous forme de « mousse au chocolat », la biodégradation sera substantiellement plus lente (Fingas, 2016). De plus, tous les hydrocarbures ne sont pas dégradés de la même façon. Les alcanes, qui sont des chaînes de carbone simples, seront dégradés en premier (Atlas, 1988; Salleh *et al.*, 2003). Les alcanes ramifiés, les alcanes cycliques et les hydrocarbures aromatiques, qui représentent des molécules plus complexes, seront dégradés plus difficilement et sur du plus long-terme (Atlas, 1981; Farrington, 2014; Leahy & Colwell, 1990). Ces molécules plus complexes peuvent néanmoins être dégradées par certains microorganismes et plus spécialement par des populations mixtes permettant d'élargir le spectre de dégradation enzymatique (Leahy & Colwell, 1990).

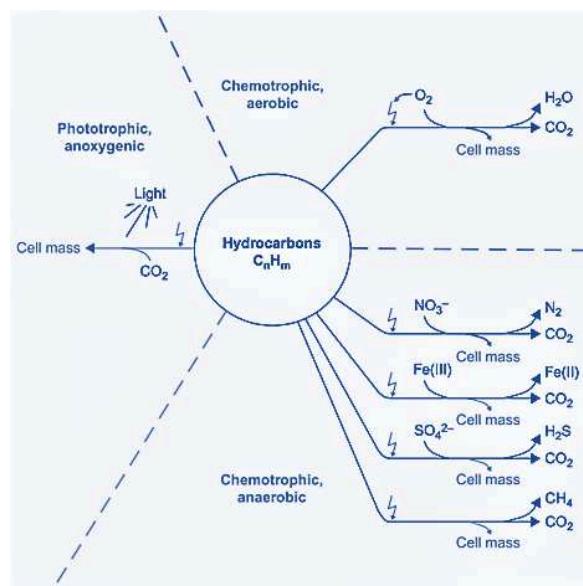


Figure 10 - Voies de dégradation microbiennes (Widdel & Rabus, 2001)

De nombreuses bactéries et nombreux champignons ont été présentés comme capables de dégrader des hydrocarbures. A titre d'exemples, parmi les bactéries, celles appartenant aux genres *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*,

Nocardia, et *Pseudomonas* spp. font partie des meilleurs candidats dégradeurs d'hydrocarbures (Leahy & Colwell, 1990) tandis que chez les champignons, ce sont les genres *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* qui semblent les plus efficaces (Barnes *et al.*, 2018; Gaur *et al.*, 2022; Leahy & Colwell, 1990; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2018; Salleh *et al.*, 2003). La littérature regroupe d'ores et déjà un grand nombre de publications qui mettent en avant des microorganismes capables de dégrader des hydrocarbures, des plus simples au plus complexes (Tableau 1). Une grande diversité y est observée. Ce potentiel de dégradation d'hydrocarbures a été montré chez un grand nombre de bactéries, mais aussi chez certains champignons endophytes, cellulolytiques, ou ubiquistes (Gaur *et al.*, 2022).

Tableau 1 - Exemples de microorganismes capables de biodégrader certains hydrocarbures
(noir : bactéries; vert : champignons filamenteux; bleu : levures)

Hydrocarbures	Microorganismes	Références
Aliphatiques	<i>Acinetobacter</i> sp.	(Foght, 2008; Mittal & Singh, 2009)
	<i>Alcanivorax</i> sp.	(Brooijmans <i>et al.</i> , 2009; Harayama <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Azoarcus</i> sp.	(Widdel & Rabus, 2001)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Das & Mukherjee, 2007; Ghazali <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Brevibacterium</i>	(Leahy & Colwell, 1990)
	<i>Desulfoarcina</i> sp.	(Jaekel <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Desulfococcus</i> sp.	(Jaekel <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Marinobacter</i> sp.	(Yakimov <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Micrococcus</i> sp.	(Ghazali <i>et al.</i> , 2004; Roy <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Ochrobactrum</i> sp.	(Varjani <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Oleispira</i> sp.	(Brooijmans <i>et al.</i> , 2009; Harayama <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mittal & Singh, 2009; Rocha <i>et al.</i> , 2011; Sajna <i>et al.</i> , 2015; Varjani <i>et al.</i> , 2015; Varjani & Upasani, 2016)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(Abbasian <i>et al.</i> , 2015; Bicca <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(Varjani <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Thalassolituus</i> sp.	(Brooijmans <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Aspergillus</i> sp.	(Al-Dossary <i>et al.</i> , 2019; Ghanem <i>et al.</i> , 2016; Khandelwal <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Candida</i> sp.	(Leahy & Colwell, 1990)
	<i>Penicillium</i> sp.	(Al-Hawash <i>et al.</i> , 2018; Atlas, 1981)

	<i>Pseudozyma</i> sp.	(Sajna <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Scedosporium boydii</i>	(April <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Trichoderma atroviride</i>	(Khandelwal <i>et al.</i> , 2021)
	<i>Verticillium</i> sp.	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Xylaria</i> sp.	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
Monoaromatiques	<i>Acinetobacter</i> sp.	(Batista <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	(Wilkes <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	(Wilkes <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Janbandhu & Fulekar, 2011)
	<i>Halomonas</i> sp.	(Widdel & Rabus, 2001)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Meckenstock <i>et al.</i> , 2016; Mittal & Singh, 2009)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(Kim <i>et al.</i> , 2002; Leahy & Colwell, 1990)
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	(Janbandhu & Fulekar, 2011)
	<i>Exophiala oligosperma</i>	(Estévez <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Paecilomyces variotii</i>	(Estévez <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Phomopsis</i> sp.	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Trichoderma</i> sp.	(Daccò <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Verticillium</i> sp.	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Xylaria</i> sp.	(Marín <i>et al.</i> , 2018)
Polyaromatiques	<i>Achromobacter insolitus</i>	(Janbandhu & Fulekar, 2011)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Mittal & Singh, 2009)
	<i>Cycloclasticus</i> sp.	(Harayama <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Phanaerochaete chrysoporum</i>	(Abo-State <i>et al.</i> , 2021; Barclay <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Meckenstock <i>et al.</i> , 2016; Widdel & Rabus, 2001)
	<i>Vibrio</i> sp.	(Widdel & Rabus, 2001)
	<i>Aspergillus</i> sp.	(Al-Hawash <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Penicillium</i> sp.	(Saraswathy & Hallberg, 2002)
	<i>Penicillium janthinellum</i>	(Boonchan <i>et al.</i> , 2000; Launen <i>et al.</i> , 1999; Leitão, 2009)
	<i>Trichoderma asperellum</i>	(Zafra <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Trichoderma harzianum</i>	(Saraswathy & Hallberg, 2002)
	<i>Xylaria regalis</i>	(Chang <i>et al.</i> , 2007)
Résines	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Leahy & Colwell, 1990)
	Membres de la famille des Vibrionaceae et Enterobacteriaceae	(Desai & Vyas, 2008)

Le processus de biodégradation est donc assuré par un large spectre de microorganismes, et il peut être fortement sollicité par l'Homme par diverses approches de bioremédiation lors d'un

déversement d'hydrocarbures. Ces approches, que sont la biostimulation et la bioaugmentation, vont conduire à induire, ou accélérer la biodégradation.

Enfin, la présence de tensioactifs peut également faciliter la biodégradation en augmentant la solubilisation et en améliorant la biodisponibilité des hydrocarbures. Ainsi, il a été montré que les complexes microbiens contenant des producteurs de bio-tensioactifs et d'autres dégradeurs d'hydrocarbures affichent des taux de biodégradation plus élevés (Barin *et al.*, 2014; Das & Chandran, 2011).

3.2. Techniques de lutte employées en cas de déversement de pétrole

Lors d'une pollution, les moyens de lutte nécessitent une réelle organisation et plusieurs moyens peuvent être mis en place (Figure 11). Ces moyens dépendent du délai d'intervention, de l'état de la mer, de la nature du polluant et enfin des caractéristiques écologiques de la zone à dépolluer (Cedre, 2006).

- *Allègement ou brûlage*

L'allègement consiste à pomper la cargaison de pétrole d'un navire et de la transférer vers un autre navire, ce qui évite une pollution côtière à venir potentielle. Le brûlage intervient de façon complémentaire à l'allègement, et permet également de réduire les quantités de pétrole sur site. Il peut être accidentel, lorsqu'en effet il y a eu explosion lors de l'accident, ou volontaire, dans le cas où l'accident vient de se produire et que l'évaporation des composés volatiles n'a pas encore eu lieu. Néanmoins cette technique peut induire des pollutions dues aux gaz de combustion ou des suies, et elle est donc très rarement utilisée à l'heure actuelle (Cedre, 2006; Fingas, 2016).

- *Confinement et récupération*

Ces techniques consistent à récupérer le polluant en surface de la mer avant qu'il ne s'étende au littoral. Leurs applications dépendent de l'état de la mer et des navires disponibles, qui doivent être en capacité de stocker un important volume. Il s'agira de récupérer le pétrole en surface, déjà émulsionné avec l'eau puis de procéder à bord à une séparation de l'émulsion afin de rejeter l'eau et réduire ainsi le volume à transporter. Pour la récupération, les navires de pêche peuvent également être utilisés de manière efficace, de par les filets de pêche ou chaluts en tractant la nappe avant que celle-ci ne s'étende (Cedre, 2006).

- *Produits absorbants*

Ces produits permettent de fixer et agglomérer le pétrole lors de l'accident. Ils sont oléophiles et vont donc plutôt retenir le pétrole que l'eau. Plusieurs matériaux peuvent être utilisés, sous forme de tapis, de poudres ou de copeaux (Bertrand *et al.*, 2015; Cedre, 2006).

- *Dispersion*

La dispersion consiste à utiliser des cocktails de molécules appelés « dispersants » qui vont permettre de dissocier la nappe de pétrole en micro-gouttelettes dans la colonne d'eau. Cela favorise ensuite la biodégradation par les microorganismes hydrocarbonoclastes (Merlin *et al.*, 2021). Ce processus est explicité et détaillé en partie 4.

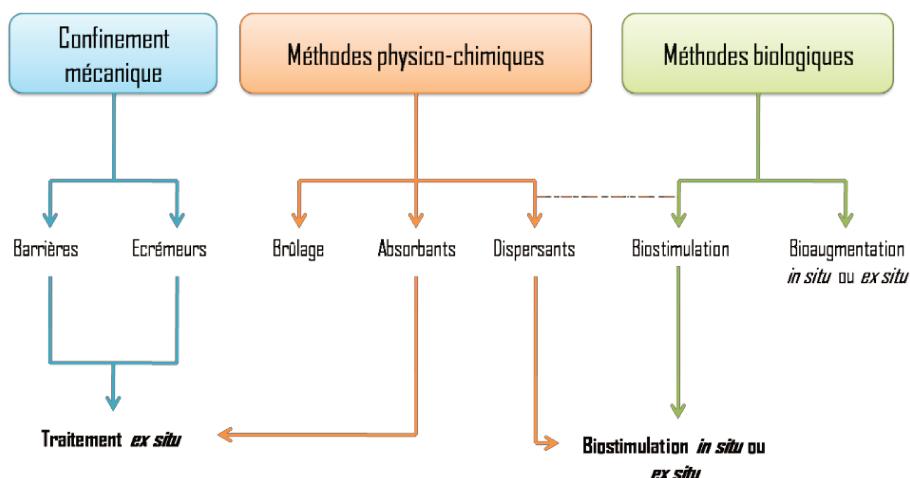


Figure 11 - Méthodes de lutte contre une pollution aux hydrocarbures en mer, d'après Bertrand *et al.*, 2015

3.3. Bioremédiation

La bioremédiation s'appuie sur le métabolisme de communautés microbiennes, ou sur l'activité de plantes en vue de dégrader ou stabiliser des polluants. Ce système de dépollution par voie biologique consiste donc à utiliser des processus naturels pour favoriser la dégradation de polluants organiques, qui seront utilisés comme sources de carbone et d'énergie (Louati, 2013; Salleh *et al.*, 2003). Ces microorganismes sont communément retrouvés dans des zones contaminées aux hydrocarbures, ce qui conforte l'hypothèse qu'ils seraient capables de croître dans de tels environnements, grâce à leur métabolisme et donc de les biodégrader.

La bioremédiation va dépendre de la capacité à établir et maintenir les conditions favorisant la biodégradation du pétrole. Ainsi il est indispensable que soient présents les microorganismes possédant le métabolisme adéquat pour dégrader le polluant, et qu'ils soient dans un environnement favorable à leur croissance (avec des concentrations en nutriments et en oxygène optimales, et à un pH compris entre 6 et 9) (Das & Chandran, 2011).

Dans le cas d'une bioremédiation intervenant suite à un déversement d'hydrocarbures en milieu marin, deux approches peuvent être envisagées : la bioaugmentation et la biostimulation (Das & Chandran, 2011). Néanmoins, l'utilisation de ces méthodes en pleine mer est limitée car il est nécessaire de contrôler les cultures de microorganismes ou les concentrations de nutriments apportés afin de ne pas perturber l'écosystème plus qu'il ne l'est par les hydrocarbures déversés (Sayed *et al.*, 2021).

3.3.1. La bioaugmentation

Cette approche consiste à intégrer des microorganismes connus pour dégrader les hydrocarbures contaminant un environnement, afin de faciliter leur dégradation. Ces communautés supplémentent donc les communautés microbiennes déjà présentes (Das & Chandran, 2011; Miyasaka *et al.*, 2006). La principale préoccupation avec ce type de produits est l'introduction d'espèces étrangères dans un écosystème donné (Ajona & Vasanthi, 2021; Sayed *et al.*, 2021).

La bioaugmentation est un processus qui n'est utilisé qu'en phase finale de la dépollution car cette technique repose sur la biodégradation des molécules résiduelles par des microorganismes, et implique une action sur du long terme (plusieurs mois à plusieurs années). Lorsque des *consortia* microbiens allochtones sont exposés aux déversements d'hydrocarbures, ils vont chercher à libérer des tensioactifs et à se séparer du déversement. Les microorganismes hydrocarbonoclastes vont quant à eux utiliser des enzymes intracellulaires pour dégrader les hydrocarbures et les utiliser comme source de carbone. Les *consortia* introduits sur le site pollué, peuvent avoir été, au préalable, cultivés sur des milieux de culture enrichis en hydrocarbures pétroliers afin d'obtenir des agents microbiens concentrés (Sayed *et al.*, 2021). Ils peuvent sinon provenir de cultures en bioréacteurs et fournir donc un *inoculum* conséquent, qui utilisera le pétrole comme source de carbone.

Tableau 2 - Exemple de *consortia* microbiens utilisés en bioaugmentation pour la dégradation de polluants

Polluant (v/v)	Microorganismes	Efficacité (taux de dégradation des polluants)	Temps (jours)	Références
Pétrole 0.5%	<i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> et <i>Acinetobacter</i>	66%	15	(Perdigão Mendes <i>et al.</i> , 2020)
Pétrole 1%	<i>Bacillus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	77%	25	(Sathishkumar <i>et al.</i> , 2008)
Pétrole 1%	<i>Betaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	85%	7	(Tao <i>et al.</i> , 2017)
Pétrole 1%	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Cobetia</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Microbacterium</i>	82%	7	(Hassanshahian <i>et al.</i> , 2012)
Fioul lourd 2%	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Alcanivorax dieselolei</i> , <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Cycloclasticus</i> sp., <i>Thalassolituus oleivorans</i>	79%	14	(Crisafi <i>et al.</i> , 2016)
Kérosène 5%	<i>Citrobacter sedlakii</i> , <i>Entrobacter hormeachei</i> , <i>Entrobacter cloacae</i>	69%	7	(Ghoreishi <i>et al.</i> , 2017)
Pétrole 1%	<i>Bacillus algicola</i> (003-Phe1), <i>Rhodococcus soli</i> (102-Na5), <i>Isoptericola chiayiensis</i> (103-Na4), <i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> (SDRB-Py1)	> 85%	14	(Pacwa-Płociniczak <i>et al.</i> , 2019)
Pétrole 1%	<i>Paraburkholderia</i> sp., <i>Alloprevotella tannerae</i> , <i>Paraburkholderia tropica</i> , <i>Ralstonia</i> sp., <i>Paraburkholderia fungorum</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Acidocella</i> sp., <i>Scedosporium boydii</i>	81%	7	(Bastida <i>et al.</i> , 2016)
Pétrole 2%	<i>Chlorella vulgaris</i>	94%	14	(Xaaldi Kalhor <i>et al.</i> , 2017)

Le Tableau 2 met en avant de nombreux microorganismes dont l'efficacité en bioaugmentation a pu être démontrée. Ces microorganismes ont été isolés de sites contaminés et utilisés pour leur capacité à dégrader des hydrocarbures pétroliers en milieux de culture ou en eau de mer. Parmi ces études, les genres bactériens *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter* et *Alcanivorax* sont couramment retrouvés (Koshlaf & Ball, 2017; Salleh *et al.*, 2003; Sayed *et al.*, 2021). Les taux d'efficacité affichés par les *consortia* présentés varient de 66 à 94% pour des durées de 7 à 25 jours, mais, pour des concentrations en hydrocarbures ne dépassant pas 5%.

Ainsi, cette méthode de bioaugmentation peut s'avérer efficace, mais seulement si les conditions environnementales sont favorables aux microorganismes. Le pH, la température, la concentration en nutriments et la météorologie sont les principaux facteurs qui peuvent influencer les phases d'acclimatation et de développement des organismes (Kumar *et al.*, 2019; Leahy & Colwell, 1990). En outre, si l'eau est trop mouvementée, les tensioactifs microbiens, ainsi que les enzymes produits au sein des *consortia* peuvent se retrouver totalement dilués et donc inefficaces. La bioaugmentation est donc d'intérêt pour des eaux peu mouvementées ou encore dans le cas où une nappe d'hydrocarbures est isolée par des barrières flottantes (Leahy & Colwell, 1990; Sayed *et al.*, 2021).

3.3.2. La biostimulation

La biostimulation vise à favoriser le développement de microorganismes autochtones, et capables de dégrader le pétrole, en ajoutant des nutriments nécessaires à leur croissance (Das & Chandran, 2011). Plus précisément, il s'agira d'enrichir l'environnement avec des accepteurs d'électrons tels que l'oxygène, du phosphore, de l'azote et/ou une source de carbone supplémentaire (Ajona & Vasanthi, 2021; Miyasaka *et al.*, 2006). Il a en effet été rapporté qu'une pollution aux hydrocarbures conduit à une importante réduction de ces éléments dans l'environnement (Koshlaf & Ball, 2017). Toutefois, l'ajout de nutriments doit être maîtrisé soigneusement, car un excès peut inhiber la croissance de certaines communautés microbiennes. Les additifs les plus utilisés pour favoriser le développement bactérien sont les sels de nitrate et de phosphate (Sayed *et al.*, 2021).

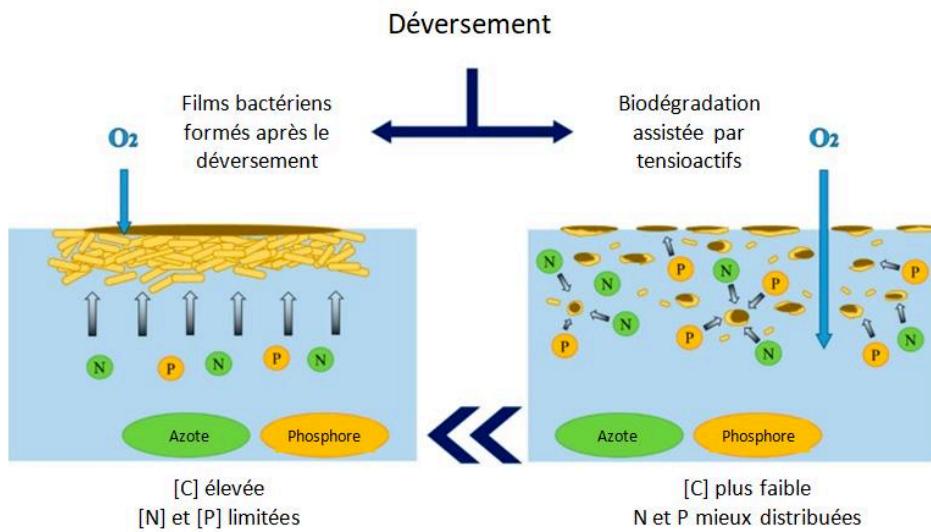
La biostimulation peut également être améliorée si elle est couplée à la bioaugmentation, c'est-à-dire en ajoutant à la fois des nutriments essentiels et des organismes hydrocarbonoclastes aux organismes déjà présents dans le milieu (Tableau 3).

Tableau 3 - Dégradation d'hydrocarbures pétroliers utilisant la double approche bioaugmentation/biostimulation

Polluant	Microorganisme	Agent Chimique	Efficacité	Temps	Références
Pétrole 0.5%	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	Chitine, flocons de chitosan	60%	15 j	(Gentili <i>et al.</i> , 2006)
Pétrole 0.1%	<i>Thalassolituus, Alcanivorax, Cycloclasticus</i>	Nutriments (20 mg/L NH ₄ NO ₃ et 10 mg/L KH ₂ PO ₄)	85%	30 j	(McKew <i>et al.</i> , 2007)
Alcanes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Liqueur de maïs	80%	30 j	(El-Gendy <i>et al.</i> , 2014)
Pétrole 10%	<i>Aspergillus niger, Pseudomonas aeruginosa</i>	NPK 15:15:15	94%	8 sem	(Amenaghawon <i>et al.</i> , 2014)
Pétrole 0.5%	<i>Pseudomonas</i>	Déchets de culture de dattes	97%	28 j	(El Mahdi <i>et al.</i> , 2016)
Pétrole 0.5%	<i>Pseudomonas</i>	Liqueur de maïs	91%	28 j	(El Mahdi <i>et al.</i> , 2016)
Fioul lourd 2%	<i>Alcanivorax borkumensis, Alcanivorax dieselolei, Marinobacter hydrocarbonoclasticus, Cycloclasticus sp., Thalassolituus oleivorans</i>	KH ₂ PO ₄ 0.077 g/L, NH ₄ Cl 0.2 g/L and NaNO ₃ 0.1 g/L	73%	14 j	(Crisafi <i>et al.</i> , 2016)
Pétrole 1%	<i>Bacillus algicola, Rhodococcus soli, Isoptericola chiayiensis, Pseudoalteromonas agarivorans</i>	Bio-tensioactifs	>85%	14 j	(Pacwa-Płociniczak <i>et al.</i> , 2019)
Alcanes	Consortium de Pseudomonadota	Tensioactif (Polysorbate 80) et bio-tensioactif (rhamnolipides)	80%	7 j	(Staninska-Pięta <i>et al.</i> , 2019)

Comme présenté dans le Tableau 3, de nombreuses études rapportent l'efficacité de dégradation de communautés bactériennes et fongiques, en présence de nutriments supplémentant les milieux. Les dégradations d'hydrocarbures varient entre 60 et 99% et sur un délai allant de 7 jours à 8 semaines. La combinaison de la bioaugmentation et de la biostimulation semble bel et bien afficher une efficacité importante. Les genres bactériens *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Alcanivorax* ressortent à nouveau dans ces études et le genre fongique *Aspergillus* apparaît également être d'intérêt afin d'améliorer l'efficacité de dégradation. Ces études mettent également en avant l'intérêt d'utiliser des tensioactifs, qui aident à la biodisponibilité des hydrocarbures. Staninska *et al.* (2019) ont conclu dans leur étude que l'utilisation des tensioactifs a permis d'améliorer la dégradation des hydrocarbures testés, mais que leur utilisation a conduit à un changement au sein des populations

microbiennes. De plus, l'utilisation du polysorbate 80, bien qu'efficace, est susceptible de s'accumuler dans l'environnement, tandis que les rhamnolipides testés, bien que facilement biodégradés dans l'environnement, diminuent la minéralisation des fractions de diesel. Finalement, il est indispensable d'optimiser les concentrations de ces agents de surface et de prendre en compte les effets environnementaux de leur utilisation (Staninska-Pięta *et al.*, 2019). Utiliser des tensioactifs améliore en effet la répartition des hydrocarbures mais aussi des nutriments tels que l'azote et le phosphore, essentiels aux microorganismes (Figure 12) (Lawniczak *et al.*, 2020).



**Figure 12 - Amélioration de la biodégradation par utilisation de tensioactifs, d'après
Lawniczak *et al.*, 2020**

4. La stratégie de dispersion : vers des alternatives durables

NB : Cette partie va reprendre différents points présentés en amont. En effet, les termes de dispersion, dispersants, tensioactifs et bio-tensioactifs y seront explicités et détaillés en vue d'introduire au mieux le cœur du sujet de la thèse.

4.1. Les dispersants

Les dispersants sont des agents chimiques qui peuvent être utilisés comme moyen de lutte contre une pollution aux hydrocarbures. Lorsque les moyens de lutte mécanique ne sont pas ou plus possibles, il est courant de faire appel à ces molécules.

Les dispersants ont été classés en générations. Les premières générations, utilisées dans les années 60, correspondaient à des nettoyants industriels fortement toxiques pour

l'environnement marin. Les dispersants de seconde génération se sont avérés moins toxiques que les premiers, mais étaient également moins efficaces. Ils étaient constitués de solvants hydrocarbonés, et de 15 à 25% de tensioactifs. Ils devaient donc être épandus à de forts volumes, pour un rapport 1 : 1 (dispersant : pétrole) (ITOPF, 2011). Ces dispersants de première et deuxième génération ne sont désormais plus utilisés et ont laissé place aux dispersants de troisième génération.

Les dispersants modernes sont des mélanges complexes de tensioactifs neutres et anioniques, mis en présence de glycol et de solvants à base de distillats de pétrole légers (ITOPF, 2011). Ils permettent d'abaisser la tension de surface entre la nappe de pétrole et l'eau, puis sous l'action de la houle et de turbulences, ils vont favoriser la dispersion du pétrole sous forme de micro-gouttelettes (<70 µm) dans la colonne d'eau (Prince, 2015). L'objectif final à l'utilisation de ces molécules est de promouvoir une dispersion dans la colonne d'eau et donc de favoriser la biodégradation des hydrocarbures déversés (Fingas, 2000).

Leur utilisation est largement réglementée et est propre à chaque pays (Figure 13). Ils ne sont en effet pas utilisés dans des eaux stagnantes ni dans des zones sensibles (comme dans les mangroves par exemple) et des profondeurs minimales pour la pulvérisation doivent être respectées. Ces profondeurs varient d'un pays à un autre. A titre d'exemples, pour la France, ces profondeurs minimales sont de 10 m tandis qu'à Malte, elles sont de 60 m. Cette différence dans les profondeurs autorisées peut être due à la variation du climat et de la topographie, qui entraîne une dilution variable, et elles sont choisies en grande partie en fonction du potentiel de dilution adéquate et de la distance par rapport à la côte (Chapman *et al.*, 2007).

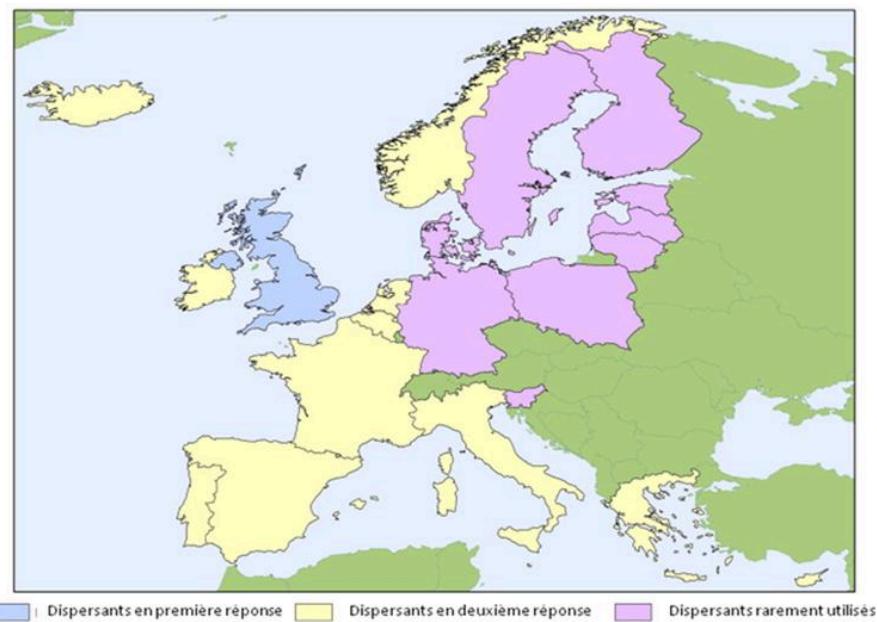


Figure 13 - Pays utilisant les dispersants en réponse aux déversements pétroliers, d'après Chapman *et al.* (2007)

Les concentrations de pétrole dispersé peuvent atteindre dès les premières minutes 1000 ppm, mais ces concentrations diminuent fortement au cours du temps puisque le volume est dès lors proportionnellement plus important (Prince, 2015). A titre d'exemple, une goutte de 1 mm de diamètre sera dispersée en 10 000 gouttes de 45 µm, s'étalant sur une surface 20 fois plus large que la surface initiale (ITOPF, 2011).

Entre 1995 et 2005, sur les 258 accidents maritimes, 46 ont subi un épandage de dispersants, soit 18%, ce qui représente une proportion non négligeable des moyens de lutte employés (Chapman *et al.*, 2007). Un des recours aux dispersants le plus marquant est celui ayant eu lieu lors de l'explosion de la plateforme pétrolière de *Deepwater Horizon* en 2010 dans le Golfe du Mexique. Plus de 795 millions de litres de pétrole ont été relargués dans l'océan et pour limiter la pollution, 7 millions de litres de dispersants ont été épandus (Kleindienst *et al.*, 2015).

Ces utilisations de dispersants sont cependant controversées car plusieurs études ont mis en avant leur potentielle toxicité sur des communautés microbiennes, des invertébrés, des poissons, etc. (Kleindienst, 2015).

La toxicité des dispersants est notamment déterminée par leur LC50. Il s'agit de la concentration minimale qui cause la mort de 50% des organismes dans le cas d'une expérimentation. La truite arc-en-ciel peut être l'un de ces organismes modèles. Les dispersants de première génération affichent une LC50 allant de 5 à 50 mg/L chez la truite

arc-en-ciel, alors qu'elle est comprise entre 200 et 500 mg/L pour les dispersants utilisés à l'heure actuelle (Fingas, 2000). Ces derniers restent moins toxiques que certaines huiles, comme le diesel ou le pétrole léger qui atteignent une LC50 allant de 20 à 50 mg/L, dans le cas où ces hydrocarbures subissent une dispersion naturelle (Fingas, 2000).

D'après la revue de littérature de Wise et Wise parue en 2011, qui présente la toxicité d'environ 30 dispersants commerciaux, les impacts sur les organismes étudiés conduisent la plupart du temps à la mort de ces derniers à des LC50 plus faibles que le pétrole seul. Ainsi, le Corexit 9500, épandu lors de l'explosion de la plateforme de *Deepwater Horizon*, impacte l'espèce de crevette *Americamysis bahia* à une LC50 de 900 ppm, les espèces de poissons *Cyprinodon variegatus* et *Menidia beryllina* à une LC50 de 670 et 76 ppm respectivement, et la bactérie *Vibrio fisheri*, à une EC50 de 170 ppm (Fuller *et al.*, 2004). D'après cette même étude, il a été conclu que le mélange dispersant/pétrole était autant毒ique sur ces organismes que le pétrole seul.

Dans le cas du déversement de *Deepwater Horizon*, de nombreuses études ont démontré les effets létaux sur les communautés planctoniques, benthiques, et de poissons (Buskey *et al.*, 2016). L'exemple d'impact le plus marquant est le changement très rapide de coloration des coraux et l'apparition de squelettes vides signifiant la mort de ces derniers (White *et al.*, 2012).

Malgré les améliorations apportées aux formulations des dispersants, la toxicité du mélange dispersant/pétrole pour la faune et la flore marines demeure une préoccupation centrale à leur utilisation. Dans certains pays, comme le Canada ou les Etats-Unis, la facilité avec laquelle les dispersants se biodégradent est une préoccupation majeure et l'utilisation de ces produits doit être autorisée en amont par les autorités en charge (Fingas, 2000 ; Kleindienst, 2015).

4.2. Les tensioactifs

4.2.1. Structures et propriétés

Comme décrit précédemment, les dispersants sont constitués de tensioactifs. Ces composés possèdent des structures particulières qui leur permettent de diminuer les tensions de surface (l'eau ayant une tension de surface de 75 mN/m à 20°C, qui en présence de tensioactifs peut rapidement chuter à 30 mN/m) en se plaçant à l'interface d'une phase polaire et d'une phase

apolaire. Ils sont dits amphiphiles car ils possèdent une partie apolaire soluble dans l'huile et une partie polaire soluble dans l'eau (Figure 14) (Larpent, 1995).

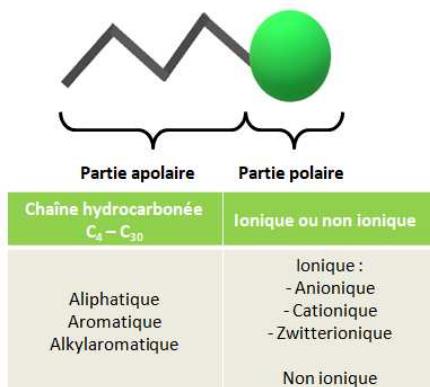


Figure 14 - Composition d'une molécule tensioactive

La partie apolaire comporte une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées qui vont, en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre de saturations, déterminer son caractère hydrophobe. La partie hydrophile quant à elle peut être ionique (anionique, cationique ou zwitterionique) ou non ionique. Les tensioactifs anioniques sont les plus utilisés en industrie, ils possèdent un groupement chargé négativement. Ce groupement peut être de type carboxylate (CO_2^-), sulfate (SO_4^-), sulfonate (SO_3^-) ou phosphate (PO_4^-). Les tensioactifs cationiques comportent quant à eux un groupement chargé positivement de type ammonium quaternaire (NH_4^+). Enfin, les tensioactifs zwitterioniques sont constitués à la fois d'un groupement cationique et d'un groupement anionique et sont donc neutres. Les tensioactifs zwitterioniques les plus utilisés sont les betaïnes ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$) et les sulfobétaïnes ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$) (Larpent, 1995; Myers, 2005).

Les tensioactifs dits non ioniques, comportent quant à eux des groupements fonctionnels non chargés constitués d'hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. Ces groupements peuvent être de type alcool, ester, amide ou éther (Larpent, 1995).

Les tensioactifs sont très largement utilisés car leurs propriétés sont multiples. Ils ont la capacité de s'adsorber aux interfaces mais aussi de s'autoagrérer pour former des micelles. Les phénomènes décrits ci-dessous de mouillage, de dispersion, de détergence, d'émulsification, et de solubilisation peuvent ainsi être induits de par ces propriétés (Myers, 2005).

Le *mouillage* a lieu lorsqu'il y a interaction entre un solide et un liquide. Les tensioactifs vont réduire la tension de surface entre les deux et donc permettre au liquide de s'étendre sur une plus grande surface à la surface du solide.

La *dispersion*, comme décrite précédemment en 3.2., est permise par le phénomène d'émulsion provoquée lorsque des tensioactifs sont mis en présence de phases polaires et apolaires.

La *détergence* a lieu principalement entre deux solides et se fait par la présence de tensioactifs en formulation avec d'autres composants. Elle permet lors d'une action de nettoyage de séparer deux interfaces (Myers, 2005).

La *solubilisation* est permise par la micellisation des tensioactifs dans laquelle un composé apolaire se retrouve à l'intérieur de la partie hydrophobe de micelles. La taille de ces micelles va déterminer la capacité de solubilisation, or, la taille de ces micelles dépend de la nature des tensioactifs. Les tensioactifs non ioniques donnent lieu à des micelles de plus grande taille que ceux formés par les ioniques (Larpent, 1995).

Enfin, *l'émulsification* est le phénomène qui conduit à la formation d'émulsions, qui conduisent à l'élaboration de gouttelettes d'un liquide provenant de la phase discontinue dans un second liquide (phase continue).

Ces phénomènes dépendent de l'équilibre hydrophile-lipophile, HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) qui est un paramètre déterminant pour l'utilisation d'un tensioactif. Il a été introduit par Griffin en 1949 et se calcule différemment en fonction des molécules. La HLB permet de mesurer l'équilibre entre les parties hydrophobe et hydrophile du tensioactif sur une échelle allant de 0 à 20. Plus la valeur de HLB est élevée plus le tensioactif est hydrophile, inversement, plus la valeur est proche de 0, plus le tensioactif est hydrophobe. Les tensioactifs ayant des HLB faibles vont favoriser des émulsifications eau dans huile mais également le mouillage tandis que des tensioactifs avec des HLB élevées vont plutôt favoriser la solubilisation dans l'eau (Tableau 4).

Autre critère à prendre en compte, la CMC, ou concentration micellaire critique, qui correspond à la concentration la plus faible à laquelle le nombre de micelles formés par les tensioactifs est maximal. Elle permet d'optimiser les quantités de tensioactifs à incorporer dans une solution en vue de son émulsification ou de sa solubilisation. En d'autres termes, elle permet de déterminer la concentration à laquelle l'émulsion demeurera stable. Elle dépend du pH, de la force ionique et de la température de la solution.

Ces deux valeurs sont importantes car elles permettent de classer les tensioactifs d'après leurs applications potentielles.

Tableau 4 - Applications des tensioactifs selon leur HLB (d'après Larpent, 1995)

HLB	Applications
3 à 6	Emulsification eau/huile
7 à 9	Mouillage
8 à 18	Emulsification huile/eau
15 à 18	Solubilisation dans l'eau
3 à 15	Détergence

4.2.2. Toxicité des tensioactifs

Les tensioactifs, bien que largement utilisés, suscitent de grandes interrogations et controverses quant à leur toxicité. D'un point de vue écotoxicologique, ils présentent une activité biologique marquée. D'une part, les tensioactifs anioniques peuvent se lier à des macromolécules bioactives telles que les peptides, les enzymes et l'ADN. La liaison aux protéines et aux peptides peut modifier le repliement de la chaîne polypeptidique et la charge de surface d'une molécule et donc modifier leur fonction biologique. D'autre part, les tensioactifs cationiques tendent à cibler la membrane cytoplasmique interne des bactéries. Les ammoniums quaternaires (présents dans certains tensioactifs cationiques) se lient aux membranes internes et les désorganisent grâce à leur longue chaîne alkyle. Les tensioactifs non ioniques peuvent quant à eux exercer une activité antimicrobienne en se liant à diverses protéines et membranes phospholipidiques. Cette liaison augmente la perméabilité des membranes et des vésicules, provoquant la fuite de composés de faible masse moléculaire. Cela peut entraîner la mort cellulaire ou des dommages par perte d'ions ou d'acides aminés (Ivanković & Hrenović, 2010). Les tensioactifs SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), anionique, et Triton X-100, non ioniques ont présenté tous les deux des activités néfastes sur des bactéries en conditions d'étude (Cho *et al.*, 1990; Mariani *et al.*, 2006).

Les tensioactifs cationiques sont présentés comme étant les plus toxiques. Plus généralement, l'usage excessif des tensioactifs est susceptible d'affecter les écosystèmes. D'autres études ont mis en avant la toxicité de détergents et de tensioactifs non ioniques et anioniques sur des invertébrés, sur des plantes et sur des vertébrés (Endo *et al.*, 1969; Mariani *et al.*, 2006; Pettersson *et al.*, 2000; Warne & Schifko, 1999).

L'étude de la toxicité avérée des tensioactifs conventionnels a conduit au développement d'alternatives moins toxiques. Ainsi, la recherche s'est focalisée sur l'utilisation de molécules moins néfastes pour les organismes vivants, biodégradables et qui conservent, malgré tout, les propriétés propres aux tensioactifs.

4.3.Les bio-tensioactifs

4.3.1. Propriétés des bio-tensioactifs

Suite aux prises de conscience concernant la toxicité des tensioactifs, de nombreux projets de recherche se sont portés sur les bio-tensioactifs. Ces derniers deviennent une alternative attrayante sur le marché, car ils sont produits à partir de différentes sources naturelles et durables.

Les bio-tensioactifs possèdent les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les tensioactifs conventionnels. Ils sont amphiphiles, comportent une partie polaire et une partie apolaire, permettent les phénomènes de mouillage, de dispersion, d'émulsification et de solubilisation. Mais, ils présentent plusieurs avantages par rapport aux tensioactifs synthétiques d'origine chimique : ils sont moins toxiques, biodégradables, possèdent un pouvoir moussant élevé, sont plus respectueux de l'environnement, et proviennent de matières premières de faible coût (Banat, 2014). Ainsi, ils sont plus sûrs et constituent une meilleure alternative aux tensioactifs chimiques, notamment pour une utilisation dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, et cosmétique (Akbari *et al.*, 2018).

Un bio-tensioactif peut réduire la tension superficielle de l'eau de 75 à 32 mN/m (à 20°C), au même titre que les tensioactifs conventionnels (Banat, 2014).

Les bio-tensioactifs sont représentés par un large spectre de groupes de molécules, synthétisées par de très nombreux organismes et particulièrement par les bactéries et les champignons.

4.3.2. Classes de bio-tensioactifs et microorganismes producteurs

Contrairement aux tensioactifs synthétisés chimiquement, qui sont classés en fonction de la nature de leur groupe polaire, les bio-tensioactifs sont classés principalement selon leur composition chimique et leur origine microbienne. Leur partie hydrophile est principalement composée d'acides aminés ou de peptides, d'anions ou de cations, de mono-, di- ou

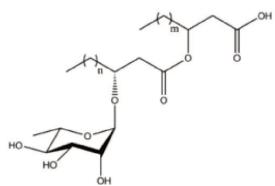
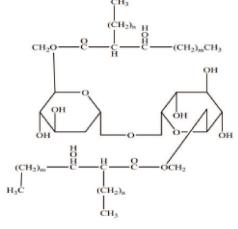
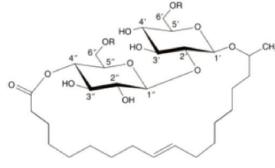
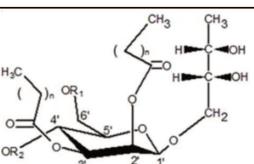
polysaccharides, et leur partie hydrophobe principalement d'acides gras saturés et insaturés (Bami *et al.*, 2022).

Les bio-tensioactifs peuvent être répartis en deux classes principales (i) les bio-tensioactifs à faible poids moléculaire, regroupant les glycolipides et les lipopeptides et (ii) ceux à haut poids moléculaire, ou bio-émulsifiants et regroupant des polymères tels que les polysaccharides, protéines, lipoprotéines, lipopolysaccharides par exemple (Banat & Thavasi, 2018).

- *Les Glycolipides*

Les glycolipides rassemblent les molécules composées de longues chaînes lipidiques reliées à des sucres. Ils regroupent les rhamnolipides, les sophorolipides, les tréhalolipides, les mannosylerythritol lipides (MEL), les xylolipides, et les cellobioses lipides (Tableau 5).

Tableau 5 – Microorganismes producteurs et structures des glycolipides

Type de glycolipides	Structure de la molécule	Microorganismes producteurs	Références
Rhamnolipides		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i>	(Herzog <i>et al.</i> , 2020; Irerere <i>et al.</i> , 2017; Nalini & Parthasarathi, 2014)
Tréhalolipides		<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Micrococcus luteus</i> <i>Nocardia</i> sp.	(Arutchelvi & Doble, 2010; Jimoh <i>et al.</i> , 2021)
Sophorolipides		<i>Rhodotorula bogoriensis</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Wickerhamiella domercqiae</i>	(Arutchelvi & Doble, 2010; Li <i>et al.</i> , 2020)
MEL		<i>Ustilago</i> sp. <i>Pseudozyma</i> sp. <i>Kurtzmanomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp.	(Arutchelvi & Doble, 2010; Coelho <i>et al.</i> , 2020)

Xylolipides		<i>Pichia caribbica</i> <i>Lactococcus lactis</i>	(da Silva <i>et al.</i> , 2021; Joshi Navare <i>et al.</i> , 2014; Saravanakumari & Mani, 2010)
Cellobiose lipides		<i>Pseudozyma</i> sp. <i>Trichosporon porosum</i>	(da Silva <i>et al.</i> , 2021; Kulakovskaya <i>et al.</i> , 2010; Morita <i>et al.</i> , 2013)

Les **rhamnolipides** possèdent une ou deux unités de rhamnose liées à une ou deux unités d'acides gras β -hydroxylés avec une longueur de chaîne typique de C8 à C12. Ils sont presque exclusivement connus pour être synthétisés chez le genre *Pseudomonas* (Banat & Thavasi, 2018).

Les **tréhalolipides** contiennent un tréhalose sur la partie hydrophile et sont retrouvés chez plusieurs genres bactériens tels que *Nocardia*, *Rhodococcus* ou encore *Arthrobacter* (Arutchelvi & Doble, 2010).

Les **sophorolipides** sont composés de disaccharides de sophorose reliés à une longue chaîne carbonée de 16 à 18 atomes de carbone. Ils sont connus pour être synthétisés chez des levures telles que *Rhodotorula*, *Wickerhamiella* mais l'espèce *Starmerella bombicola* (anciennement *Candida bombicola*) est la plus connue et la plus utilisée pour la production de sophorolipides (Oliveira *et al.*, 2015).

Les **mannosylerythritol lipides** sont constitués d'une partie hydrophile constituée de chaînes d'acides gras contenant des groupements particuliers, (4-O β -D-mannopyranosyl-erythritol ou 1-O- β -D-mannopyranosylerythritol) reliés à des chaînes carbonées (hydrophobes). Ils sont connus pour être produits par des levures, en particulier *Pseudozyma* et *Candida*, et des champignons filamenteux (*Ustilago maydis*) (Morita *et al.*, 2015).

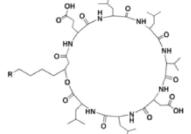
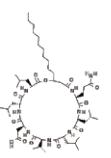
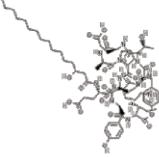
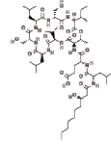
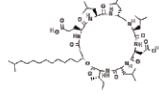
Les **xylolipides** sont composés d'une partie hydrophile méthyl-2-O-méthyl-d-xylopyranoside, reliée aux parties hydrophobes d'acide octadécanoïque. Ils sont peu étudiés mais connus chez *Pichia caribbica* et *Lactococcus lactis* (Jimoh *et al.*, 2021; Saravanakumari & Mani, 2010).

Enfin, les **cellobioses lipides** sont constitués d'acide : 16-O-(2",3",4",6'-tétra-O-acétyl- β -cellobiosyl) - 2 hydroxyhexadécanoïque et synthétisés par des levures (*Trichosporon* et *Pseudozyma*).

- *Les lipopeptides*

Le groupe des lipopeptides/lipoprotéines présente une classe hétérogène de peptides biologiquement actifs. Les lipopeptides contiennent deux régions principales : une ou des queue(s) acyle(s) et une courte séquence oligopeptidique linéaire contenant une liaison amide. La queue hydrophobe comprend une chaîne hydrocarbonée et la tête hydrophile comprend une séquence peptidique. La partie peptidique comporte des résidus cationiques et anioniques mais aussi dans certains cas des acides aminés non protéiques (Carolin *et al.*, 2021).

Tableau 6 - Exemples de lipopeptides et de microorganismes les produisant

Type de lipopeptides	Structure de la molécule	Microorganismes producteurs	Références
Surfactine		<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micromonospora marina</i> <i>Brevibacterium brevis</i>	(Fei <i>et al.</i> , 2020; Krishnan <i>et al.</i> , 2019; Ramalingam <i>et al.</i> , 2019)
Lichenysine		<i>Bacillus</i> sp.	(Czinkóczky & Németh, 2020)
Polymyxine		<i>Paenibacillus polymixa</i>	(Zhan <i>et al.</i> , 2019)
Fengycine		<i>Bacillus</i> sp.	(Ben Ayed <i>et al.</i> , 2014; Rangarajan <i>et al.</i> , 2015; Sa <i>et al.</i> , 2018)
Viscosine		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Bonnichsen <i>et al.</i> , 2015)
Pumilacidine		<i>Bacillus</i> sp.	(Ben Ayed <i>et al.</i> , 2014; Brack <i>et al.</i> , 2015; Domingos <i>et al.</i> , 2015)

Les lipopeptides regroupent un grand nombre de molécules complexes (Tableau 6), connues pour être produites pour la plupart chez des bactéries. A titre d'exemple, la surfactine est un lipopeptide cyclique présentant de nombreuses propriétés, notamment anti-bactérienne, anti-virale, et anti-fongique. Elle est également utilisée comme émulsifiant ou stabilisant alimentaire (Bami *et al.*, 2022; Carolin *et al.*, 2021).

- *Acides gras et phospholipides*

Certaines bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de phospholipides lorsqu'elles croissent sur des milieux riches en *n*-alcanes. Leur utilisation est large, et les phospholipides sont notamment utilisés comme émulsifiants en pharmaceutique (composants de médicaments administrés sous forme d'émulsions, de suspensions, de complexes ou de dispersions solides) (Sałek & Euston, 2019). Ils sont présents naturellement dans les parois cellulaires des animaux, plantes et microorganismes. Ils sont constitués d'un squelette de glycérol auquel sont attachés deux acides gras et une partie d'acide phosphorique. Certains phospholipides sont capables de produire de petites gouttelettes d'huile pendant l'homogénéisation des phases polaires et apolaires, mais les gouttelettes formées sont néanmoins très sensibles aux changements des conditions environnementales. L'inconvénient des phospholipides est qu'ils peuvent se disperser dans la phase huileuse, ou la phase aqueuse avant l'homogénéisation des deux phases (McClements & Gumus, 2016).

- *Bio-tensioactifs polymériques*

Un grand nombre de micro-organismes ont été identifiés comme producteurs de bio-tensioactifs polymériques, donc à haut poids moléculaire. Beaucoup de bactéries, notamment les genres *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus* et de levures du genre *Candida* sont connues pour cette capacité (Santos, 2016).

Les bio-tensioactifs polymériques peuvent être de différentes natures, ils peuvent être constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides, de lipoprotéines ou d'un mélange de ces éléments. A l'inverse des autres bio-tensioactifs, ces molécules ne peuvent pas réduire efficacement la tension de surface mais ils sont efficaces pour émulsifier, c'est-à-dire qu'ils permettent de réduire la tension interfaciale entre des liquides non miscibles et permettent de former des émulsions stables (Banat *et al.*, 2010).

L'émulsan, bio-tensioactif polymérique synthétisé par *Acinetobacter calcoaceticus*, le liposan synthétisé par *Yarrowia lipolytica* (ex *Candida lipolytica*) et l'alasan produit par *A. radioresistens* sont les exemples les plus connus (Banat *et al.*, 2010).

4.3.3. Utilité des bio-tensioactifs dans la bioremédiation

Les bio-tensioactifs revêtent un intérêt croissant de par leurs multiples propriétés et avantages. Des études ont d'ores et déjà été conduites quant à leur utilisation en bioremédiation. Ils permettent en effet la biodisponibilité de contaminants environnementaux, en émulsifiant et solubilisant par exemple des contaminants organiques lourds et favorisent ainsi leur biodégradation (Amodu *et al.*, 2014).

D'une part, ils peuvent être utilisés dans le cadre de contaminations aux éléments traces métalliques (zinc, plomb, chrome ou cuivre), avec lesquels ils peuvent se complexer ou former des micelles constituées du complexe bio-tensioactifs-métalo Ces micelles peuvent alors diffuser et améliorer les performances de la bioremédiation (Bami *et al.*, 2022).

D'autre part, ils peuvent influencer le taux de biodégradation des hydrocarbures en augmentant le processus de décomposition par deux mécanismes : i) en augmentant la solubilité des hydrocarbures pétroliers, ii) en contrôlant l'interaction entre les cellules bactériennes et les substances pétrolières, réduisant ainsi la tension superficielle entre les deux phases (Bami *et al.*, 2022; Bertrand *et al.*, 1994; Effendi *et al.*, 2018). Les bio-tensioactifs à faible poids moléculaire sont capables de réduire la tension de surface tandis que ceux à haut poids moléculaire peuvent efficacement émulsifier et stabiliser l'émulsion de pétrole dans un milieu aqueux. Ils peuvent donc être utilisés à des fins de dépollution lors de déversements d'hydrocarbures (Bami *et al.*, 2022).

Il a été montré que l'utilisation de bio-tensioactifs produits par une bactérie marine *Bacillus circulans* a permis la solubilisation, et donc la biodisponibilité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, et plus particulièrement de molécules d'anthracène (Das *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation de rhamnolipides en présence de consortium bactérien hydrocarbonoclaste (*Pseudomonas aeruginosa* et *Rhodococcus erythropolis*) a largement accéléré et favorisé la biodégradation d'hydrocarbures contenus dans un sol pollué (Das & Chandran, 2011).

4.4. Les bio-tensioactifs fongiques

Comme présenté ci-dessus, de nombreux microorganismes ont été étudiés pour leur potentiel de production de biotensioactifs. Parmi eux, il s'avère que les bactéries et les levures sont les plus représentées. Les champignons filamenteux, outre *Ustilago maydis*, ressortent bien moins et pourtant ils sont réputés pour la production de nombreux métabolites secondaires. Ce constat peut être nuancé car ces dernières années, il est en effet apparu de plus en plus de publications se concentrant sur la production de biotensioactifs par les champignons (Tableau 7).

Les champignons, en général, produisent une plus grande quantité de biotensioactifs que les bactéries, ce qui peut s'expliquer par la forte teneur en composés amphiphiles des parois cellulaires rigides de ceux-ci (Luft *et al.*, 2020).

Tableau 7 - Biotensioactifs produits par les champignons

Champignons	Biotensioactifs	Références
<i>Aspergillus flavus</i>	Glycosides	(Ishaq <i>et al.</i> , 2015)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	(Castiglioni <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	-	(Asgher <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aspergillus terreus</i>	Cerato-platanines	(Pitocchi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéines	(Kiran <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Glycerol-liamocine	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
<i>Candida antartica</i>	MEL	(Adamczak & Bednarski, 2000)
<i>Candida batistae</i>	Sophorolipides	(Konishi <i>et al.</i> , 2008)
<i>Candida ishiwadae</i>	Monoacylglycérol	(Thanomsub <i>et al.</i> , 2004)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glycolipides	(Santos <i>et al.</i> , 2013)
<i>Candida parapsilosis</i>	Docosenamide	(Garg <i>et al.</i> , 2018)

<i>Candida sphaerica</i>	-	(Luna <i>et al.</i> , 2015)
<i>Candida tropicalis</i>	Glycolipides	(Almeida <i>et al.</i> , 2021)
<i>Cladosporium resinae</i>	Cladosan	(Muriel <i>et al.</i> , 1996)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Glycolipides	(Andrade <i>et al.</i> , 2018; De Souza <i>et al.</i> , 2018)
<i>Curvularia lunata</i>	Biotensioactif polymérique	(Paraszkiewicz <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	Glycolipides	(Balan <i>et al.</i> , 2019)
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Monoglycerides	(Chiewpattanakul <i>et al.</i> , 2010)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Tréhalolipides	(Reis <i>et al.</i> , 2018)
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	(Sanches <i>et al.</i> , 2018)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Enamide	(Bhardwaj <i>et al.</i> , 2015)
<i>Fusarium</i> sp.	Lipopeptides	(Qazi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mucor circinelloides</i>	Glycolipides	(Chotard <i>et al.</i> , 2022; Hasani zadeh <i>et al.</i> , 2018)
<i>Mucor hiemalis</i>	Glycolipides	(Ferreira <i>et al.</i> , 2020)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Lipopeptides	(Gunjan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium citrinum</i>	Glycolipides	(Camargo-de-Moraes <i>et al.</i> , 2003)
<i>Penicillium</i> sp.	-	(A. Luna <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pleurotus djamor</i>	Lipopeptides	(Velioglu & Ozturk Urek, 2015)
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	MEL	(Andrade <i>et al.</i> , 2017)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Glycoprotéines	(Pele <i>et al.</i> , 2019)
<i>Rhodotorula paludigena</i>	Triacylglycerol	(Garay <i>et al.</i> , 2017)
<i>Starmerella bombicola</i>	Sophorolipides	(Cavalero & Cooper, 2003)

<i>Trametes versicolor</i>	Lipopeptides	(Lourenço <i>et al.</i> , 2018)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cerato-platanines	(Pitocchi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Trichoderma reesei</i>	Hydrophobines	(Linder <i>et al.</i> , 2001)
<i>Trichoderma</i> sp.	Lipopeptides	(Piegza <i>et al.</i> , 2021)
<i>Trichosporon asahii</i>	Sophorolipides	(Chandran & Das, 2010)
<i>Ustilago maydis</i>	Glycolipides	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ustilago scitaminea</i>	Glycolipides	(Morita <i>et al.</i> , 2011)
<i>Xylaria regalis</i>	-	(Adnan <i>et al.</i> , 2018)

De nombreux champignons ont démontré leur capacité à produire des biotensioactifs, et en particulier des glycolipides, comme cela est illustré dans le Tableau 7. Depuis quelques années, les champignons filamenteux sont plus largement étudiés et les genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Ustilago* ou encore *Xylaria* sont apparus comme prometteurs pour la production de lipopeptides, glycolipides, glycoprotéines, glycolipoprotéines ou encore des protéines comme les cerato-platanines ou les hydrophobines. Les *hydrophobines* n'ont pas été présentées en amont car ce sont des protéines uniquement synthétisées par les champignons. Elles présentent toutefois des propriétés tensioactives mais sont difficilement classables au sein des biotensioactifs.

Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (<20 kDa), contenant environ 100-150 acides aminés et possédant 8 résidus de cystéines formant 4 liaisons disulfure intramoléculaires, ce qui stabilise leur structure tertiaire et favorise les propriétés tensioactives. Elles sont divisées en 2 classes (I et II) d'après leurs caractéristiques d'assemblage aux interfaces hydrophobes-hydrophiles, et leur solubilité (da Silva *et al.*, 2021).

Les hydrophobines de classe I (SC3) ont été isolées pour la première fois chez *Schizophyllum commune* et sont structurées en feuillet-β. Elles ne sont solubles que dans les acides forts.

Les hydrophobines de classe II (HFBI et HFBII) ont été aussi isolées chez *Trichoderma reesei* et forment des structures cristallines régulières avec une conformation en spirale aléatoire.

A contrario des hydrophobines de classe I, elles peuvent être facilement dissoutes avec des solvants organiques ou des détergents (Bayry *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2021).

Les hydrophobines permettent d'aider le champignon à développer ses hyphes à partir d'une phase liquide vers l'air en recouvrant la surface des hyphes aériens d'une couche hydrophobe.

Les hydrophobines de classe I permettent également la dispersion des spores, l'adhésion, la pathogenèse et la rupture de la tension de surface (Figure 15)(Bayry *et al.*, 2012).

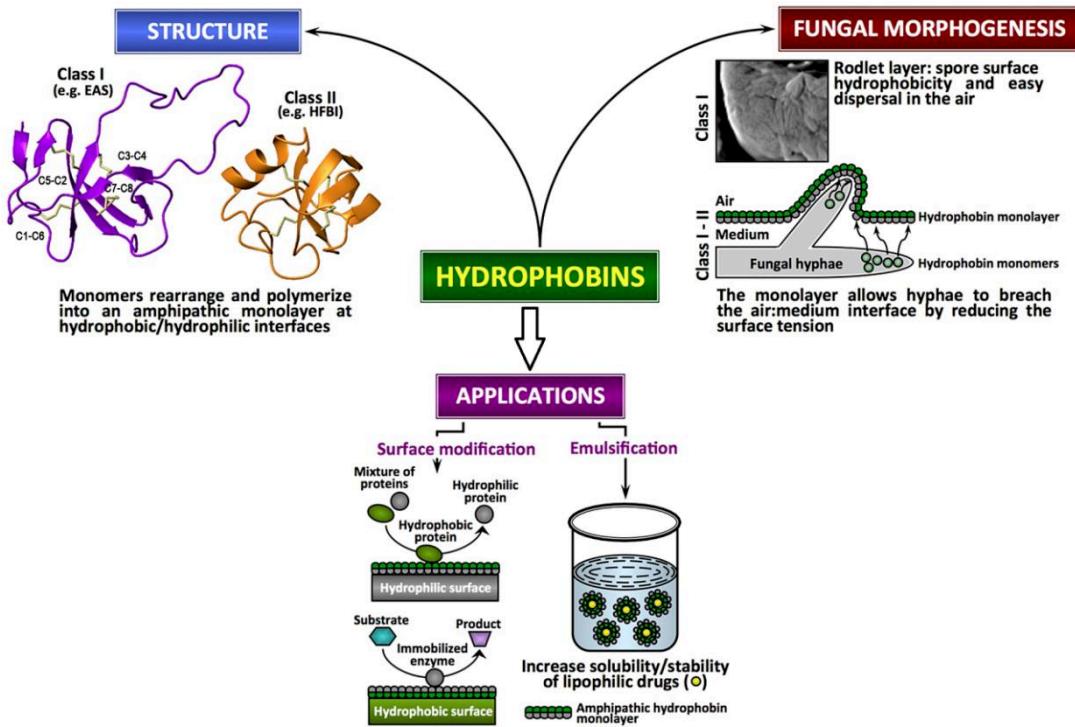


Figure 15 - Structures et applications des hydrophobines, d'après Bayry *et al.*, 2012

Les hydrophobines sont déjà utilisées en industrie, notamment en tant qu'agents de solubilisation et d'administration de médicaments hydrophobes, agents alimentaires émulsifiants, ou encore agents de revêtements de biomatériaux (da Silva *et al.*, 2021).

Globalement, ces protéines, ainsi que l'ensemble des biotensioactifs, produits par les champignons méritent de susciter l'intérêt des scientifiques. Les molécules que certains champignons peuvent produire sont multiples, avec des rendements élevés, à partir de substrats déchets, et avec des applications très diverses, en industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique mais aussi en bioremédiation. Il est tout à fait envisageable de remplacer les tensioactifs conventionnels par des biotensioactifs fongiques et de les formuler afin de mettre au point des dispersants plus respectueux de l'environnement.

II – PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Le pétrole est un mélange complexe d'hydrocarbures, simples (alcanes) et plus complexes (asphaltènes, PAH). Lors d'un accident en mer, plusieurs méthodes de dépollution sont possibles, qu'elles soient mécaniques, physico-chimiques ou biologiques, tous les facteurs environnementaux doivent être pris en compte (température, pH, météorologie, salinité, nutriments, état de la nappe). La biodégradation prend place de façon naturelle et elle peut être induite par une approche de bioremédiation (bioaugmentation et biostimulation). Cette méthode se fait sur du long-terme et affecte moins l'environnement si elle est bien contrôlée. Elle peut également être favorisée par l'utilisation de dispersants, qui vont faciliter la biodisponibilité, c'est-à-dire l'accès des hydrocarbures aux microorganismes hydrocarbonoclastes autochtones et ajoutés par bioaugmentation. Ces dispersants sont constitués de tensioactifs d'origine pétrochimique qui se sont montrés toxiques pour certains organismes vivants. Ils peuvent néanmoins être substitués par des biotensioactifs, tout aussi efficaces mais biodégradables. Ces biotensioactifs peuvent être synthétisés par un large spectre de microorganismes dont les champignons.

Dans la masse d'études menées sur la faculté des microorganismes à produire des molécules tensioactives, celles portant sur les champignons restent toutefois en nombre plus limité. C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse et dont l'objectif a été d'étudier la capacité de production de biotensioactifs par les champignons afin de lutter contre les pollutions maritimes aux hydrocarbures. Parmi les champignons, la capacité de production de biotensioactifs par des espèces appartenant au phylum des Mucromycota avait été relativement peu étudiée. La première partie expérimentale de cette thèse a donc visé à cibler, optimiser et caractériser le potentiel de production de 24 souches incluant 7 espèces de *Mucor*, 3 de *Lichtheimia* et 1 du genre *Absidia*.

Dans la deuxième partie expérimentale de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que les environnements contaminés aux hydrocarbures pouvaient constituer un réservoir de champignons producteurs de bio-tensioactifs. Afin de vérifier cette hypothèse et d'étudier la diversité des champignons présentant cette activité, des échantillonnages ont été réalisés sur 4 sites de prélèvements en Bretagne au niveau de zones contaminées par des hydrocarbures. Ces échantillonnages ont été réalisés en hiver et en été et une approche culture-dépendante a été appliquée pour quantifier les populations fongiques présentes et étudier la diversité des champignons producteurs de biosurfactants à ces deux périodes après constitution d'une large collection de souches fongiques d'origine environnementale. En parallèle, une approche

culture-indépendante (metabarcoding) a été réalisée afin de déterminer la diversité fongique présente dans les échantillons prélevés au sein de chaque site. L'ensemble des isolats ont été ciblées pour leur capacité à produire des molécules tensioactives. Les souches présentant une activité surfactante ont été sélectionnées puis identifiées par des méthodes moléculaires.

Dans la troisième partie expérimentale de cette thèse, l'activité surfactante de la souche *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 isolée au cours de l'étude précédente et présentant une activité prometteuse, a été étudiée de manière plus approfondie. Tout d'abord, la réalisation d'un plan d'expérience a permis d'optimiser la production de tensioactifs chez cette souche via une étude de l'effet de la composition du milieu de culture fongique. Une montée en échelle a ensuite été conduite afin de valider les paramètres de culture pour lequel l'activité était conservée. L'activité surfactante d'extraits bruts a été ensuite caractérisée plus finement à une échelle de laboratoire afin d'établir le potentiel de dispersion du candidat sélectionné. Enfin, les molécules tensioactives de ce candidat d'intérêt ont été concentrées, et sont en cours de caractérisation par des techniques de chimie analytique (MALDI-TOF et RMN).

Ainsi, il s'agit à travers ce travail de répondre aux questions scientifiques suivantes :

- **Quelle est la diversité des champignons produisant des molécules tensio-actives ?**
- **Quel est l'impact des conditions de culture sur la production de ces molécules ?**
- **Quelle est l'efficacité de ces molécules *in situ* (dépollution marine) en comparaison avec les solutions existantes ?**
- **Quelle est la nature chimique des molécules produites ?**

RÉSULTATS

CHAPITRE I : Production de bio-tensioactifs par des champignons du phylum des Mucoromycota

I- Résumé des travaux

Comme précédemment décrit, les champignons sont capables de produire des bio-tensioactifs. Le phylum des Mucoromycota n'a cependant été que faiblement étudié dans la littérature. En effet, seuls *Mucor hiemalis* et *Mucor circinelloides* ont été étudiés pour leur production de glycolipides (Ferreira *et al.*, 2020; Hasani zadeh *et al.*, 2018). Dans cette étude, 24 souches du phylum des Mucoromycotina ont été criblées. Parmi les 24 souches, 7 espèces de *Mucor*, 3 espèces de *Lichtheimia* et 1 espèce d'*Absidia* ont été étudiées.

Les souches ont été cultivées sur des milieux favorisant la production de molécules tensioactives, les surnageants ont été récupérés, filtrés et testés pour leur activité. Les tests ont permis de cribler les souches rapidement et en mettant en avant des propriétés propres aux tensioactifs. Le *Parafilm M Test*, consiste à placer une goutte de surnageant à la surface de parafilm et à mesurer l'étalement de la goutte, permettant ainsi de montrer l'hydrophobicité du surnageant testé. Le *Oil Spreading Test* consiste quant à lui à placer une goutte de surnageant sur une couche d'huile, étalée sur une surface d'eau, et permet de mettre en avant le pouvoir repousseur du surnageant (Figure 16).

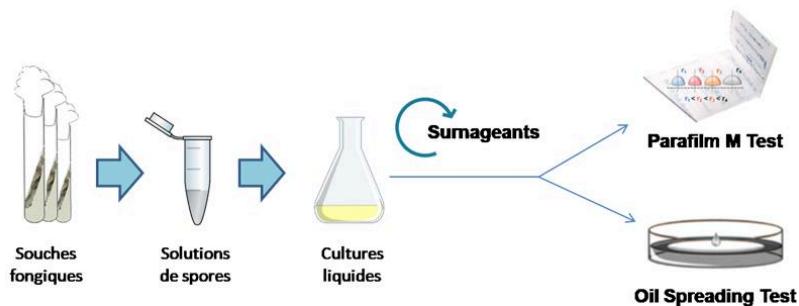


Figure 16 - Schéma décrivant l'approche utilisée pour cribler l'activité surfactante

Les huit souches ayant présenté les meilleurs résultats ont été sélectionnées et ont été utilisées pour sélectionner le milieu le plus favorable pour la production de tensioactifs.

Cette étape a conduit à la sélection du milieu BSF5, composé de 20 g/L d'huile de colza, 5 g/L de glucose et 5 g/L d'extrait de levures.

Les trois souches les plus prometteuses, *Mucor circinelloides* UBOCC-A-109190, *Mucor plumbeus* UBOCC-A-111133, et *Mucor mucedo* UBOCC-A-101353 ont été sélectionnées et la tension de surface et l'activité emulsifiante de leurs surnageants de culture ont été mesurées. Ceux-ci présentaient une activité émulsifiante négligeable mais une forte capacité à abaisser la tension de surface.

Les tensioactifs produits par ces trois souches, ont été caractérisés par chromatographie sur couche mince. D'après ces résultats, les tensioactifs produits appartenaient à la famille des glycolipides.

Ces résultats ont été publiés dans le journal *Applied Microbiology*, le 1^{er} mars 2022.

II- Article publié dans *Applied Microbiology*

Chotard M, Mounier J, Meye R, Padel C, Claude B, Nehmé R, Da Silva D, Floch SL, Lucchesi M-E. Biosurfactant-Producing *Mucor* Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Applied Microbiology*. 2022; 2(1):248-259.
<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010018>



Article

Biosurfactant-Producing *Mucor* Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization

Mélanie Chotard ^{1,2}, Jérôme Mounier ¹, Raissa Meye ¹ D, Carole Padel ¹, Bérengère Claude ³, Reine Nehmé ³, David Da Silva ³, Stéphane Le Floch ² and Marie-Elisabeth Lucchesi ^{1,*}

¹ Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Université de Brest, F-29280 Plouzané, France; melanie.chotard@univ-brest.fr (M.C.); jerome.mounier@univ-brest.fr (J.M.); raissa56@hotmail.fr (R.M.); carole.padel@outlook.com (C.P.)

² Cedre, F-29200 Brest, France; stephane.le.floch@cedre.fr

³ Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans, UMR CNRS 7311, F-45067 Orléans, France; berengere.claude@univ-orleans.fr (B.C.); reine.nehme@univ-orleans.fr (R.N.); david.da-silva@univ-orleans.fr (D.S.)

* Correspondence: lucchesi@univ-brest.fr

Abstract: Biosurfactants are amphiphilic molecules with surface tension reducing activities. Among biosurfactant producers, fungi have been identified as promising organisms. While many studies have investigated biosurfactant production in fungal species from the Ascomycota and Basidiomycota phyla, less is known concerning species from the Mucromycota phylum. In this context, the aim of this study was to screen and optimize biosurfactant production in 24 fungal strains, including seven *Mucor*, three *Lichtheimia*, and one *Absidia* species. After cultivation in a medium stimulating surfactant production, the surface activity of cell-free supernatants was measured using both oil spreading and parafilm M tests. Among them, five *Mucor* strain cell-free supernatants belonging to *M. circinelloides*, *M. lanceolatus*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, and *M. plumbeus*, showed oil repulsion. Then, the impact of the medium composition on surfactant production was evaluated for eight strains. Three of them, i.e., *Mucor circinelloides* UBOCC-A-109190, *Mucor plumbeus* UBOCC-A-111133, and *Mucor mucedo* UBOCC-A-101353 showed an interesting surfactant production potential, reducing the medium surface tension to 36, 31, and 32 mN/m, respectively. A preliminary characterization of the surfactant molecules produced by these strains was performed and showed that these compounds belonged to the glycolipid family.

Keywords: biosurfactants; fungi; *Mucor*



Citation: Chotard, M.; Mounier, J.; Meye, R.; Padel, C.; Claude, B.; Nehmé, R.; Da Silva, D.; Floch, S.L.; Lucchesi, M.-E. Biosurfactant-Producing *Mucor* Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Appl. Microbiol.* **2022**, *2*, 248–259. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010018>

Academic Editor: Marios Mataragas

Received: 27 January 2022

Accepted: 25 February 2022

Published: 1 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Surfactants are defined as amphiphilic molecules that are able to reduce tension at phase interfaces, emulsify oil in water and water in oil, as well as help in stable gel and foam formation [1,2]. Synthetic and chemical surfactants are produced from petrochemicals and are increasingly used, even though they may have an impact on the environment and human health. Hence, there is a need to develop alternative molecules such as biosurfactants [3].

When it comes to surfactants produced from biological sources, e.g., bacteria and fungi, they can be divided into biosurfactants and bioemulsifiers. Biosurfactants are low molecular weight compounds produced by microorganisms, which possess high surface tension reducing and low emulsification activities [2]. They can be differentiated from bioemulsifiers, which are of a high molecular weight and possess a high emulsification activity, but little or negligible surface tension reducing properties [2]. Because of their functional properties as well as their biodegradability and low toxicity for the environment, these compounds are of great interest to replace existing synthetic surfactants for different sectors such as the pharmaceutical, cosmetic, and food industries, as well as in the field of

pollutant remediation [4–6]. They are divided into a large number of molecules, but the best known are glycolipids, which include rhamnolipids, sophorolipids, and mannosylerythritol lipids. Biosurfactants are already present on the market and many companies produce glycolipids, mainly rhamnolipids and sophorolipids, which confirm the renewed interest in these molecules [7].

Bacteria are currently the most studied biosurfactant producers, with *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. being among the highest surfactant producers [8]. In contrast, fungi have been less studied than bacteria [9]. Nevertheless, a quite large number of studies have highlighted biosurfactant production in yeasts and filamentous fungi, mostly belonging to the Ascomycota phylum, e.g., *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, and *Penicillium* spp. [3]. Sophorolipids, which are notably produced by the yeast *Starmerella bombicola* (syn. *Candida bombicola*) [10] and other *Starmerella* spp., are probably the class of fungal surfactant that has attracted the most attention during the last decades. Other biosurfactant-producing filamentous fungi include *Aspergillus ustus* [11], *Ustilago maydis* [12], *Fusarium fujikuroi*, and *Penicillium chrysogenum* [13], producing biosurfactants from the glycolipoprotein, glycolipid, trehalolipid, and lipopeptide families.

Among other fungal phyla, the potent ability of members of the Mucoromycota phylum, including *Mucor*, *Lichtheimia*, and *Absidia* spp., to produce surfactant has not been studied to a large extent. The *Mucor*, *Lichtheimia*, and *Absidia* genera all belong to the Mucorales order, of which *Mucor* is the largest genus with 63 currently recognized species [14,15]. *Mucor*, *Lichtheimia*, and *Absidia* spp. are often ubiquitous and some species are known for their positive and negative impact on human activities, such as their involvement in the manufacture of fermented foods (e.g., cheese and cereal-based fermented foods) or their role in food spoilage and as causative mycosis agents, respectively [16,17]. In addition, *Mucor*, *Lichtheimia*, and *Absidia* spp. are also interesting organisms for biotechnological applications such as metabolite production, e.g., enzymes (lipases and proteases), polyunsaturated fatty-acids and biofuel production, and biotransformation (e.g., terpenoid production and the transformation thereof) [17,18]. Biosurfactant production in the *Mucor* genus has been examined, but not to a great extent. Among *Mucor* spp., *Mucor circinelloides* [19], *Mucor hiemalis* [20], and *Mucor indicus* [21] were found as efficient biosurfactant producers, while to the best of our knowledge, there are no data available concerning *Lichtheimia* and *Absidia* spp. In this context, the present study aimed to provide insight into the production of biosurfactants/bioemulsifiers by filamentous fungi belonging to the Mucoromycotina phylum. Twenty-four strains, including seven *Mucor* species, three *Lichtheimia*, and one *Absidia* species were screened for their potential to produce surfactant molecules. Then, the impact of medium composition was studied for eight strains presenting surfactant activities. Finally, emulsifying and surfactant activities of the three most promising strains were further investigated and a preliminary characterization of the produced molecules was performed. This study highlights the production of surface-active compounds by *Mucor* species that have been little studied for this feature.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal Strains and Spore Suspension Preparation

Twenty-four fungal strains (Table 1), belonging to the Mucoromycotina phylum, were obtained from the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France). For preparing the spore suspension, each strain was cultivated for 7 days at 25 °C on potato dextrose agar (PDA) slants. Then, spores were harvested using 3 mL of sterile water and the spore concentration enumerated using a Malassez Cell. After centrifugation for 5 min at 5000×*g*, a sufficient sterile water volume was added to get a calibrated spore suspension at 10⁷ spores/mL.

Table 1. Fungal strains used in this study.

Strain Number	Species	Isolation Source	Strain Code
UBOCC-A-109190	<i>Mucor circinelloides</i>	Insect	MC1
UBOCC-A-109191	<i>Mucor circinelloides</i>	Sediments	MC2
UBOCC-A-109192	<i>Mucor circinelloides</i>	Air	MC3
UBOCC-A-109193	<i>Mucor lanceolatus</i>	Raclette cheese	ML1
UBOCC-A-110148	<i>Mucor lanceolatus</i>	Brie cheese rind	ML2
UBOCC-A-101355	<i>Mucor lanceolatus</i>	Unknown	ML3
UBOCC-A-109195	<i>Mucor spinosus</i>	Cheese	MS1
UBOCC-A-101363	<i>Mucor spinosus</i>	Unknown	MS2
UBOCC-A-109212	<i>Mucor racemosus</i>	Cheese	MR1
UBOCC-A-109213	<i>Mucor racemosus</i>	Cheese rind	MR2
UBOCC-A-109214	<i>Mucor racemosus</i>	Yoghurt	MR3
UBOCC-A-111133	<i>Mucor plumbeus</i>	Fresh dairy product	MP1
UBOCC-A-111125	<i>Mucor plumbeus</i>	Air	MP2
UBOCC-A-111128	<i>Mucor plumbeus</i>	Fresh dairy product	MP3
UBOCC-A-101364	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Unknown	MB1
UBOCC-A-102004	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Eggs	MB2
UBOCC-A-109052	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Soil	MB3
UBOCC-A-101353	<i>Mucor mucedo</i>	Unknown	MM1
UBOCC-A-101361	<i>Mucor mucedo</i>	Cow feces	MM2
UBOCC-A-101362	<i>Mucor mucedo</i>	Maize	MM3
UBOCC-A-102006	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Eggs	AC
UBOCC-A-101332	<i>Lichtheimia spinosa</i>	Air	AS
UBOCC-A-101331	<i>Lichtheimia ramosa</i>	Cow digestive tract	AR
UBOCC-A-101330	<i>Absidia glauca</i>	Rumen	AG

2.2. Cultivation Media and Growth Conditions

2.2.1. Preliminary Screening of Surfactant Production

All of the tested isolates were first cultivated in BSF5 medium (see composition in Table 2), a pre-optimized medium for surfactant production, previously autoclaved for 15 min at 121 °C. Fungal isolates were grown in 100 mL of medium in a 250-mL Erlenmeyer flask with an initial spore concentration of 5×10^5 spores/mL and were incubated for 96 h at 25 °C on a rotary shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) at 150 rpm. After incubation, culture broth was centrifuged at $8000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The supernatant was filtered on 1.2 µM pore size fiberglass filters (Grosseron, Couëron, France) followed by filtration on 0.45 µm pore size cellulose acetate filters and then used for screening tests, i.e., oil spreading (OST) and Parafilm M test (PMT) tests, as described below. The cultures were carried out in triplicate.

Table 2. Composition of the tested media for biosurfactant production.

Medium	Glucose (g/L)	Yeast Extract (g/L)	Canola Oil (g/L)	Groundnut oil (g/L)	Linseed Oil (g/L)
BSF1	20	5	5	0	0
BSF2	20	2.5	5	0	0
BSF3	5	5	10	0	0
BSF4	5	5	15	0	0
BSF5	5	5	20	0	0
BSF6	20	5	20	0	0
BSF7	5	5	0	15	0
BSF8	5	5	0	0	15

2.2.2. Impact of Medium Composition on Surfactant Production,

Seven additional media, whose composition is shown in Table 2, were then tested for biosurfactant production on eight strains, yielding positive results for either one or both the OST and PMT, using the same culture conditions and cell-free supernatant preparation procedure as described above, and subjected to OST and PMT. Furthermore, the effect of prolonged incubation time (144 h) during growth on the supernatant surfactant activity was evaluated in the BSF5 medium. For all these tested conditions, the dry biomass was also determined at the end of cultivation for a single culture after drying cells for 72 h at 55 °C in an oven (Carbolite-Gero, Eragny, France).

2.3. Detection of Surface-Active Compounds in Culture Supernatants

Different methodologies were applied to detect surface active compounds in cell-free supernatants (CFS), including OST, PMT, emulsion index after 24 h (E24), and surface tension (ST) measurements. OST and PMT were applied as initial screening tests on all tested isolates, as well as to assess the impact of the medium composition and incubation time on a subset of selected strains. E24 and ST were applied on three selected strains for further characterization of CFS. All tests were performed in triplicate.

2.3.1. Oil Spreading Test (OST)

OST was performed as described previously [22], with slight modifications. Briefly, 25 mL of distilled water was placed in a 9-cm-diameter polystyrene Petri dish. Then, 15 µL of crude oil was deposited on the water surface in the Petri dish center, and after 2 min, 15 µL of CFS was placed on the oil surface. OST was considered as positive when a halo was observed on the surface, indicating the presence of surface-active compounds in the CFS. SDS 20% and distilled water were used as a positive and negative control, respectively. Repulsion diameters were measured for comparing the obtained values for each tested strain and medium.

2.3.2. Parafilm M Test

Parafilm M tests were performed as described previously [23]. First, 15 µL of CFS was deposited on parafilm (Parafilm M®, Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA), previously fixed on graph paper. Then, drop diameters were manually measured. To allow for comparison between the Parafilm M test results of the strains cultivated in different media, the drop diameter of the uninoculated culture medium was subtracted from that of the CFS.

2.3.3. Emulsification Index (E24)

The emulsification index was determined as described previously [24], on *Mucor circinelloides* MM1, *Mucor mucedo* MC1, and *Mucor plumbeus* MP1 CFS. Briefly, 1 mL of diesel and 1 mL of cell free supernatant were placed in a test tube, followed by vortexing for 2 min at maximum speed. The tubes were left to stand for 24 h and the emulsion height was measured. The index was calculated according to the following formula:

$$\text{Emulsification index} = (\text{Height of the emulsion layer}/\text{Total height}) \times 100$$

2.3.4. Surface Tension Measurement

The surface tension of CFS was determined as described previously [25]. For this, the CFS density was determined using a density meter (DMA4500M, Anton Paar, Graz, Austria) and was integrated for measuring surface tension using the du Nouy ring type method on a TD2 tensiometer (Lauda, Lauda-Königshofen, Germany). Calibration on ethanol and pure water was made and the control was set on the non-inoculated BSF5 medium. All measurements were done at room temperature after carefully dipping the platinum ring until equilibrium was reached. The standard deviation was set to 0.01.

2.4. Biosurfactant Extraction

Biosurfactant extraction was performed as described elsewhere [11,26]. Supernatants were acidified to pH 2 with 1 M HCl and stored at 4 °C for 24 h. They were then centrifuged at 8000× g for 20 min and the precipitate was recovered. The precipitate was then neutralized with 0.067 M phosphate buffer at pH 7. After placing this solution in a separatory funnel, an equal volume of ethyl acetate was added. After gentle stirring and decantation for 1 h, the organic phase was set aside and the process was repeated a second time. The organic phase was recovered and pooled with the first recovered solution. Ethyl acetate was then evaporated using a SpeedVac vacuum evaporator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the active fractions were stored at –20 °C until further use.

2.5. Chemical Characterization by Thin Layer Chromatography (TLC)

TLC analysis was applied on crude extracts, as described previously [26,27]. Briefly, 4 µL of crude extracts were manually spotted on a silica gel plate 60 (Merck, Darmstadt, Germany) and eluted using chloroform/methanol/water (60/30/4; v/v/v) as a mobile phase. Primulin, ninhydrin, and Molisch reagents were used for lipid, amino-acid, and carbohydrate revelation, respectively. Carbohydrate and amino-acid revelations were performed after placing TLC plates for 5 min at 100 °C in an oven. Primulin revelation was performed under UV light at 366 nm. The retention factors were then measured and compared.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using RCommander [28]. After verifying the normal distribution (Shapiro–Wilk test) of the data and the homogeneity of variances (Bartlett test), a one-way analysis of variance was used to detect significant differences among means. A Tukey's honestly significant difference (HSD, $\alpha = 0.05$) test was then applied to compare the mean values in the different tested media for each single strain and between the strains for each medium.

3. Results

3.1. Qualitative Screening of Surface Active Compound Production

As shown in Table 3, 10 out of the 24 tested strains, all belonging to the *Mucor* genus, were positive to at least one screening test (i.e., MC1, MC3, ML2, ML3, MS1, MM1, MM2, MM3, MR3, and MP1), while 5 of those (i.e., MC1, ML2, MM3, MR3, and MP1) were positive to both OST and PMT, indicative of a potent surface-active compound production. With the exception of *M. brunneogriseus*, each tested *Mucor* species harbored at least one strain showing surface active supernatants. However, within the same species, surface-active compound production was not detected in all tested strains in both tests, indicating intraspecific variability. It is also worth mentioning that more tested strains were positive to PMT than OST, highlighting the interest in applying two different tests for surface-active compound production screening.

Five strains (MC1, ML2, MS1, MM3, and MP1) showing repulsion in OST and three additional strains (MS1, MS3, and MM3) showing a surfactant with a high hydrophobicity in PMT, especially MS1 and MS3, were selected for further experimentation.

Table 3. Qualitative screening of surface-active compound production in 24 *Mucor*, *Lichtheimia* and *Absidia* spp. based on oil spreading and Parafilm M test results. Strains selected for further experimentations are shown in bold.

Species	Strain Code	Oil Spreading Test	Parafilm M Test
<i>Mucor circinelloides</i>	MC1	+	*
	MC2	-	-
	MC3	-	+
<i>Mucor lanceolatus</i>	ML1	-	-
	ML2	+	+
	ML3	-	+
<i>Mucor spinosus</i>	MS1	-	++
	MS2	-	-
<i>Mucor mucedo</i>	MM1	-	+
	MM2	-	+
	MM3	+	++
<i>Mucor racemosus</i>	MR1	-	-
	MR2	-	-
	MR3	+	+
<i>Mucor plumbeus</i>	MP1	+	+
	MP2	-	-
	MP3	-	-
<i>Mucor brunneogriseus</i>	MB1	-	-
	MB2	-	-
	MB3	-	-
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	AC	-	-
<i>Lichtheimia spinosa</i>	AS	-	-
<i>Lichtheimia ramosa</i>	AR	-	-
<i>Absidia glauca</i>	AG	-	-

*, no activity; +, halo diameter <1 cm; ++, halo diameter >1 cm.

3.2. Impact of Medium Composition

In the second part of this study, PMT and OST quantitative results were used as proxies to evaluate and compare surfactant production for eight selected strains grown in eight different media (Figure 1, and Supplementary Tables S1 and S2). Noteworthy, all strains grew well in the tested media, yielding dry biomass ranging between 4.5 and 19.2 g/L (mean biomass = 10.2 g/L), depending on the studied strain and tested media (data not shown). As shown in Figure 1, the medium used in which yeast extract concentration, glucose concentration, oil nature, and canola oil concentration were set at different levels, strongly affected PMT (Figure 1A) and OST (Figure 1B) values, independently of the studied strain. Indeed, despite a thorough evaluation of the effect of each individual factor was not performed in the present study, several observations could be made based on the obtained results. Concerning the effect of the yeast extract concentration, decreasing its concentration from 5 g/L (BSF1) to 2.5 g/L (BSF2), while keeping the other medium components constant, significantly reduced the PMT and OST values for most of the tested strains, with the exception of MR3, as well as ML2 and MR3 strains, for which a significant increase was observed for the PMT and OST values, respectively. Moreover, substitution of canola oil (BSF4) by groundnut oil (BSF7) or linseed oil (BSF8) significantly reduced the OST values of most strain CFS (i.e., MM1, MM3, ML2, MC3, MC1, and MS1), while the PMT values were significantly decreased when groundnut oil was used (i.e., MM1, MP1, MS1, ML2, MC1, and MC3). In addition, a slight increase in PMT values was observed in the presence of linseed oil. Concerning the effect of canola oil concentration, an increase from 10 (BSF3) to 15 (BSF4) and 20 (BSF5) g/L resulted in increased PMT values at 20 g/L, but not at 15 g/L. In contrast, at the latter two concentrations, OST values were significantly more increased for most of the tested strains in the media, with increased canola oil concentrations set to 15 or 20 g/L as compared to 10 g/L, while there were little differences between the media containing 15 or 20 g/L. Finally, combining high glucose and canola oil concentrations

(BSF6) yielded significantly lower PMT and OST values for all tested strains, with the exception of the MP1 strain, compared to conditions with low glucose and high canola oil concentrations (BSF5).

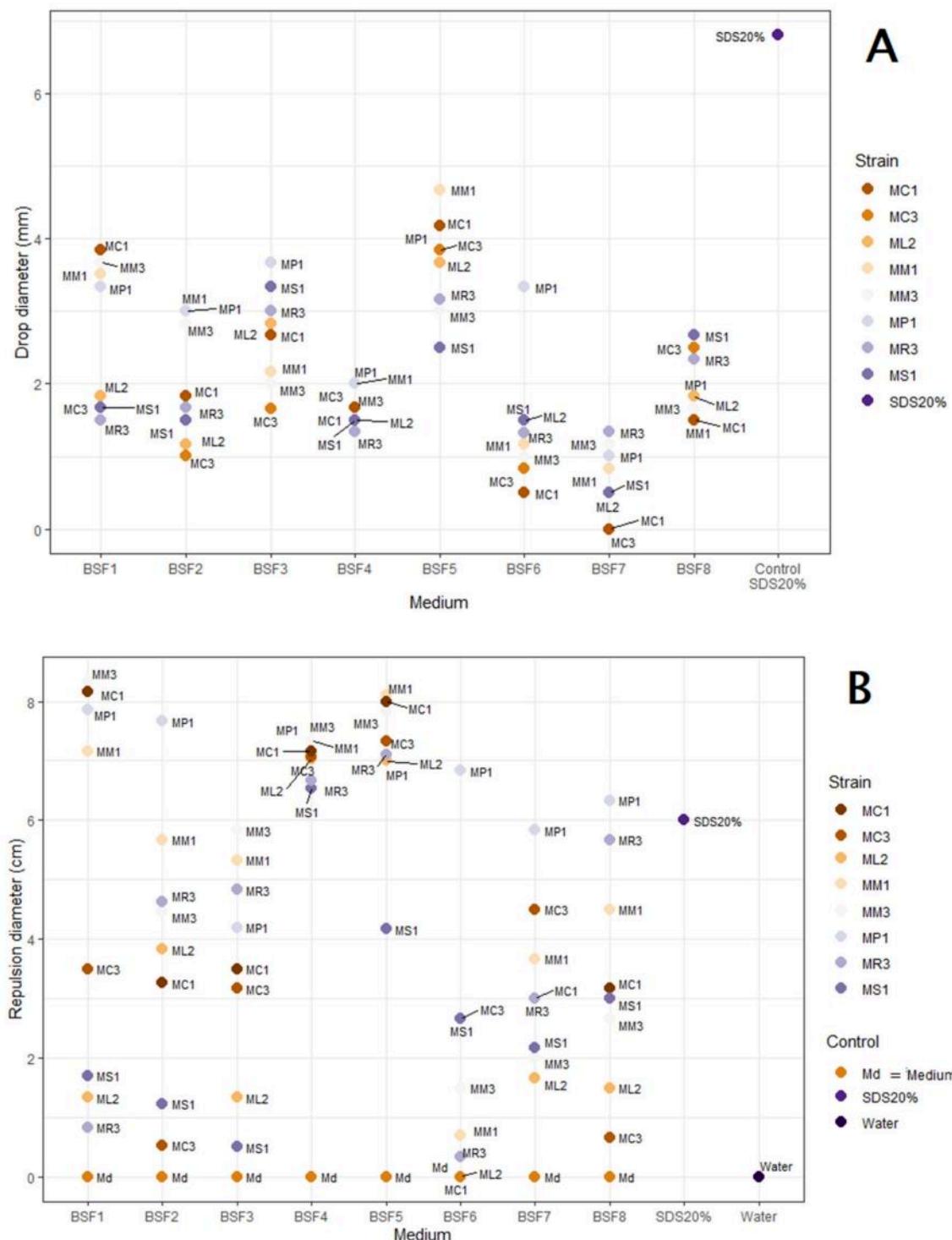


Figure 1. PMT (A) and OST (B) values of eight *Mucor* spp. (MC, *M. circinelloides*; ML, *M. lanceolatus*; MM, *M. mucredo*; MP, *M. plumbeus*; MR, *M. racemosus*; MS, *M. spinosus*) grown in eight different media (see Table 2 for medium composition).

Altogether, these results showed that the BSF5 medium yielded significantly higher PMT and OST values for most of the studied strains (MM1 and MC1 showing the strongest

activities). In addition, while PMT values of CFS obtained from BSF5 were significantly lower than SDS 20%, which was used as a positive control, the CFS OST values of all selected strains, with the exception of MS1 strain, were significantly higher than that of SDS 20%. Finally, extension of cultivation time from 96 h to 144 h did not have any significant effect on CFS OST and PMT values (data not shown). Based on these results, three strains, i.e., *M. circinelloides* MC1, *M. mucedo* MM1, and *M. plumbeus* MP1, were selected for further characterization of their surfactant activities and preliminary characterization of the surfactant molecules.

3.3. Surface-Tension Reducing and Emulsifying Activities

In the third part of the present study, surface-tension reducing and emulsifying activities of BSF5 CFS obtained from *M. circinelloides* MC1, *M. mucedo* MM1, and *M. plumbeus* MP1 were determined using ST measurements and the E24 test. The three *Mucor* CFS did not show *mucedo* MM1 and *M. plumbeus* MP1, and reduced the surface tension of BSF5 medium from 46.76 ± 0.01 mN/m to 32 ± 0.01 mN/m and 31 ± 0.01 mN/m, respectively while *M. circinelloides* MC1 reduced the surface tension to 36 mN/m (Figure 2) for any emulsifying activity (E24 < 6.6%), but reduced surface tension.

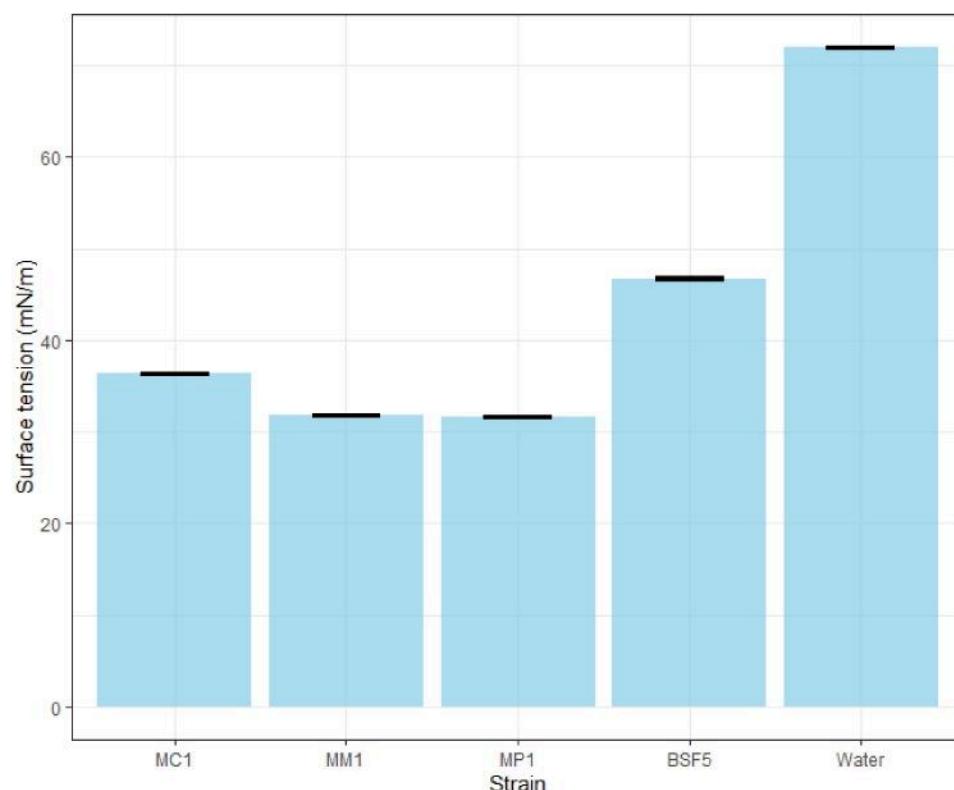


Figure 2. Surface-tension reduction of BSF5 cell-free supernatants obtained from *M. circinelloides* MC1, *M. mucedo* MM1, and *M. plumbeus* MP1. The BSF5 medium and water were used as the negative controls.

3.4. Chemical Characterization by TLC

After extraction, surface-active compounds produced by *M. circinelloides* MC1, *M. plumbeus* MP1, and *M. mucedo* MM1 were analyzed by TLC, which is a simple, fast, and low-cost method allowing for their preliminary characterization. The combination of silica as the stationary phase and chloroform/methanol/water (60/30/4; v/v/v) as the mobile phase enabled compound separation following their polarity, with R_f increasing as the polarity of analytes decreased. Thus, the same spot, at an R_f value of 0.76, obtained from the three extracts MC1, MP1, and MM1 (Figure 3A,B), indicated the presence of compounds of

a low polarity. The revelation with primulin (Figure 3A) proves that lipids were contained in this spot. Moreover, the (light) brown coloration observed with the Molisch reagent (Figure 3B) also suggested the presence of carbohydrates. All these results coincided with the fact that the three extracts contained glycolipids. The ninhydrin revelation shows that amino-acids were present in all three extracts and the BSF5 medium at the same Rf values (Figure 3C). Thus, the extracts had no peptidic compounds less polar than those contained in the BSF5 medium. From these preliminary results, we conclude that extracts did not contain lipopeptides that were expected to be less polar than the component amino-acids of the BSF5 medium.

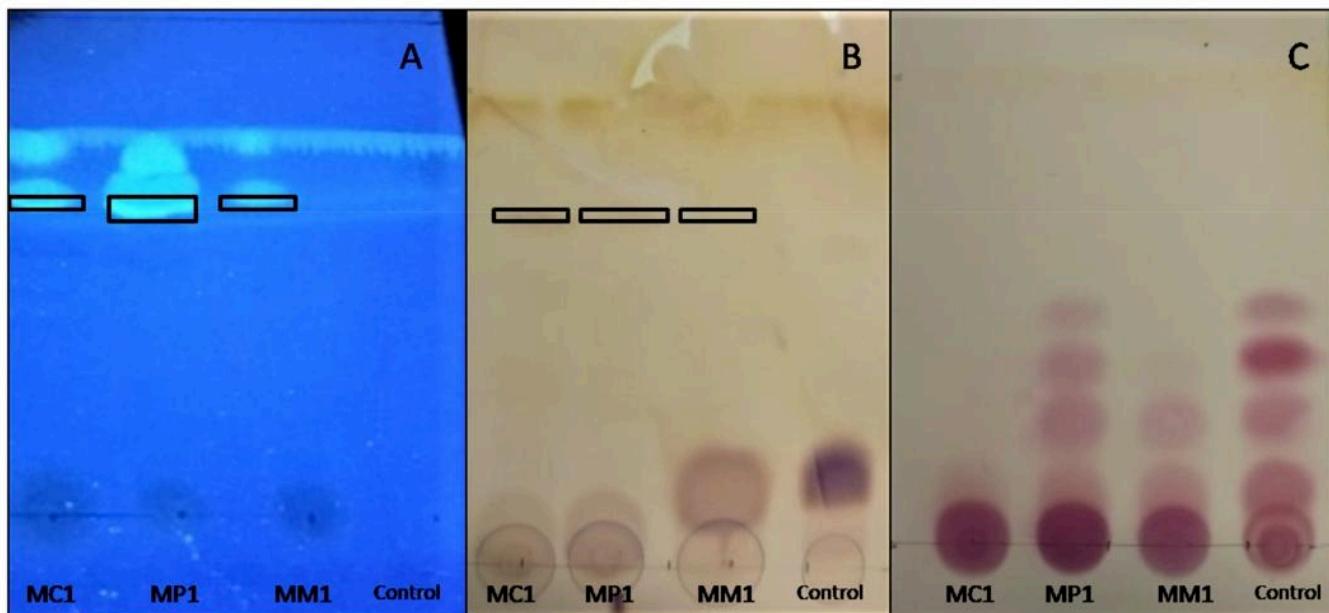


Figure 3. TLC of crude extracts of *M. circinelloides* MC1, *M. plumbeus* MP1, and *M. mucedo* MM1 and BSF5 medium (control), revealed with Primulin at 366 nm (A), Molisch (B) and Ninhydrin (C) reagents.

4. Discussion

In the present study, 24 strains belonging to seven *Mucor*, three *Lichtheimia*, and one *Absidia* species were screened using OST and PMT for their potential to produce surface-active compounds. Among the three tested *Mucor* spp., one to two strains of each species, with the exception of *M. brunneogriseus*, were positive to at least one test, highlighting that surface-active compound production is widespread in *Mucor* spp. This is not surprising from an ecological point of view, as *Mucor* spp. produce lipases in significant quantities [29] and surfactant production can increase lipid bioavailability. Noteworthy, lipase activities can also lead to the production of mono- and di-glycerides that also possess surfactant activities and may participate in the observed effect of CFS during phenotypic tests. In contrast to *Mucor* spp., none of the four tested strains of *Lichtheimia* and *Absidia* spp. were positive to OST and PMT in the studied conditions. Nevertheless, further work on a higher number of strains would be necessary to assess whether surfactant production exists in members of this genus, as surfactant production is also strain-dependent.

After this qualitative screening, PMT and OST quantitative results were used as proxies to evaluate and compare the surface-active compound production for eight selected strains grown in eight different media. To the best of our knowledge, this is the first time that these two simple and rapid tests have been used to assess the medium effect on the surfactant activity of CFS of different strains. However, it is worth mentioning that this approach only gives an indirect phenotypic evaluation of surface-active compound production in contrast

to other methods such as surface tension measurement or direct quantification of surfactant molecules.

This preliminary approach led to the selection of a BSF5 medium containing glucose (5 g/L) and canola oil (20 g/L) in a 1:4 ratio, as well as 5 g/L yeast extract. Both these factors, i.e., oil type (and its associated fatty acid profile), as well as the ratio between primary carbon source (e.g., glucose) and hydrophobic inducer (e.g., vegetable oil), can modulate biosurfactant yield at the species and intra-species level, as recently reviewed by de Oliveira Schmidt et al. (2021) [30]. Other factors including hydrophilic inducers (e.g., metals) are also known to impact surfactant production. Therefore, it would be of interest to further optimize the medium composition using an experimental design in order to maximize surfactant production using cheap renewable substrates (e.g., glycerol) and to assess the effect of each factor.

Further characterization of CFS from three selected *Mucor* spp. showed that they harbored a poor emulsifying activity, but considerably reduced surface-tension, suggesting that the produced surface-active compounds could be classified as a biosurfactant per se. Noteworthy, in the tested conditions, *M. mucedo* MM1 and *M. plumbeus* MP1 were the most effective at reducing CFS surface-tension, with similar surface-tension values as that reported for *M. hiemalis* UCP 0039 (i.e., 32 mN/m) [20]. In contrast, these values were higher than that reported for *M. circinelloides* M-06 (i.e., 26 mN/m), while the surface-tension of *M. indicus* (no strain number) and *M. circinelloides* UCP 001 CFS were not reported in the studies of Oje et al. (2016) and Marques et al. (2020), respectively [21,24]. Furthermore, in the present study, CFS from selected *Mucor* spp. did not show any emulsifying activity in contrast to *Mucor* spp. selected in the aforementioned studies, which harbored a high emulsifying activity with emulsifying index values after 24 h higher than 50% and up to 100%. This result may indicate that surface-active compounds produced by the three *Mucor* spp. selected in the present study are different from those reported in other studies.

A preliminary characterization of the surfactant molecules produced by these strains was performed and showed that these compounds belonged to the glycolipid family. Similar conclusions were drawn concerning *M. hiemalis* [20] and *M. indicus* [21] surfactants, while a surfactant from the lipopeptide class was reported for *M. circinelloides* [24]. Further work should involve purification of the produced compounds for further characterization using more powerful techniques such as LC-MS, GC-MS, and/or NMR.

5. Conclusions

In the present study, three strains of *M. circinelloides*, *M. plumbeus*, and *M. mucedo* were shown to produce biosurfactants yielding reduced-surface tension of the cultivation medium, but no emulsifying activity. Preliminary chemical analyses tend to classify these molecules in the glycolipid class, but additional analyses must be conducted to accurately characterize them. Further work could also involve their toxicity assessment and production at a higher scale, as well as exploring their application and efficiency in the depollution field, for example, to replace synthetic surfactants currently used in petroleum dispersants.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol2010018/s1>; Table S1: PMT mean values obtained for 8 *Mucor* spp. grown in 8 different media; Table S2: OST mean values obtained for 8 *Mucor* spp. grown in 8 different media.

Author Contributions: Conceptualization, M.-E.L., S.L.F. and J.M. funding acquisition, M.-E.L. and S.L.F. formal analysis, M.C., J.M. and M.-E.L. investigation, M.C., R.M. and C.P. supervision, M.-E.L., J.M., S.L.F., B.C., D.D.S. and R.N. visualization, M.C. writing—original draft preparation, M.C. and J.M.; writing—review and editing, S.L.F., M.-E.L., J.M., B.C., D.D.S. and R.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Brest Métropole and the Cedre (PhD studentship for M.C.). The authors also acknowledge the financial support of the EGAAL doctoral school and Université de Bretagne Occidentale.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors wish to thank the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France, www.univ-brest.fr/ubocc, 25 January 2022) facility and team for providing the strains used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Naughton, P.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I. Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 12–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Twigg, M.S.; Baccile, N.; Banat, I.M.; Déziel, E.; Marchant, R.; Roelants, S.; Van Bogaert, I.N.A. Microbial biosurfactant research: Time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *14*, 147–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sanches, M.A.; Luzeiro, I.G.; Cortez, A.C.A.; de Souza, S.; Albuquerque, P.M.; Chopra, H.K.; de Souza, J.V.B. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 6669263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Akbari, S.; Abdurahman, N.H.; Yunus, R.M.; Fayaz, F.; Alara, O.R. Biosurfactants—A new frontier for social and environmental safety: A mini review. *Biotechnol. Res. Innov.* **2018**, *2*, 81–90. [[CrossRef](#)]
5. Dell’Anno, F.; Sansone, C.; Ianora, A. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Mar. Environ. Res.* **2018**, *137*, 196–205. [[CrossRef](#)]
6. Jahan, R.; Bodratti, A.M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *275*, 102061. [[CrossRef](#)]
7. Moutinho, L.F.; Moura, F.R.; Silvestre, R.C.; Romão-Dumaresq, A.S. Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production. *Biotechnol. Prog.* **2021**, *37*, e3093. [[CrossRef](#)]
8. Perfumo, A.; Smyth, T.J.P.; Marchant, R.; Banat, I.M. Production and Roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Springer: Cham, Switzerland, 2010; pp. 1501–1512. [[CrossRef](#)]
9. Banat, I.; Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. Microbial biosurfactant production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 427–444. [[CrossRef](#)]
10. Drakontis, C.E.; Amin, S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *48*, 77–90. [[CrossRef](#)]
11. Kiran, S.; Hema, T.A.; Gandhimathi, R.; Selvin, J.; Thomas, T.A.; Ravji, T.R.; Natarajaseenivasan, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *73*, 250–256. [[CrossRef](#)]
12. Bhardwaj, G.; Cameotra, S.S.; Chopra, H.K. Biosurfactants from Fungi: A Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2013**, *4*, 1–6. [[CrossRef](#)]
13. Luft, L.; Confortin, T.C.; Todero, I.; Zabot, G.L.; Mazutti, M.A. An overview of fungal biopolymers: Bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2020**, *40*, 1059–1080. [[CrossRef](#)]
14. Walther, G.; Pawłowska, J.; Alastraße-Izquierdo, A.; Wrzosek, M.; Rodriguez-Tudela, J.; Dolatabadi, S.; Chakrabarti, A.; de Hoog, G. DNA barcoding in Mucorales: An inventory of biodiversity. *Pers.—Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **2013**, *30*, 11–47. [[CrossRef](#)]
15. Wagner, L.; Stielow, J.; De Hoog, G.; Bensch, K.; Schwartz, V.U.; Voigt, K.; Alastraße-Izquierdo, A.; Kurzai, O.; Walther, G. A new species concept for the clinically relevant Mucor circinelloides complex. *Pers.—Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **2020**, *44*, 67–97. [[CrossRef](#)]
16. Lee Taylor, D.; Sinsabaugh, R.L. Chapter 4—The soil fungi: Occurrence, phylogeny, and ecology. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 4th ed.; Paul, E.A., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2015; pp. 77–109.
17. Morin-Sardin, S.; Nodet, P.; Coton, E.; Jany, J.-L. Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31*, 12–32. [[CrossRef](#)]
18. Kosa, G.; Zimmermann, B.; Kohler, A.; Ekeberg, D.; Afseth, N.K.; Mounier, J.; Shapaval, V. High-throughput screening of Mucromycota fungi for production of low- and high-value lipids. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 66. [[CrossRef](#)]
19. Hasani Zadeh, P.; Moghimi, H.; Hamedi, J. Biosurfactant production by Mucor circinelloides: Environmental applications and surface-active properties. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 317–325. [[CrossRef](#)]

20. Ferreira, I.N.S.; Rodríguez, D.M.; Campos-Takaki, G.M.; Andrade, R.F.D.S. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electron. J. Biotechnol.* **2020**, *47*, 51–58. [[CrossRef](#)]
21. Oje, O.A.; Okpashi, V.E.; Uzor, J.C.; Uma, U.O.; Irogbolu, A.O.; Onwurah, I.N. Effect of Acid and Alkaline Pretreatment on the Production of Biosurfactant from Rice Husk Using *Mucor indicus*. *Res. J. Environ. Toxicol.* **2016**, *10*, 60–67. [[CrossRef](#)]
22. Morikawa, M.; Hirata, Y.; Imanaka, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1488*, 211–218. [[CrossRef](#)]
23. Yalçın, H.T.; Ergin-Tepebaşı, G.; Uyar, E. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *J. Basic Microbiol.* **2018**, *58*, 782–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Marques, N.S.A.A.; Da Silva, I.G.S.; Cavalcanti, D.L.; Maia, P.C.S.V.; Santos, V.P.; Andrade, R.F.S.; Campos-Takaki, G.M. Eco-Friendly Bioemulsifier Production by *Mucor circinelloides* UCP0001 Isolated from Mangrove Sediments Using Renewable Substrates for Environmental Applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ahmad, Z.; Arshad, M.; Asghar, H.N.; Sheikh, M.A.; Crowley, D.E.; Ali, S.; Malik, M.A.; Ansar, M.; Qureshi, R. Isolation, Screening and Functional Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria Isolated from Crude Oil Contaminated Site. *Int. J. Agric. Biol.* **2016**, *18*, 542–548. [[CrossRef](#)]
26. Schulz, D.; Passeri, A.; Schmidt, M.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V.; Gunkel, W. Marine Biosurfactants, I. Screening for Biosurfactants among Crude Oil Degrading Marine Microorganisms from the North Sea. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **1991**, *46*, 197–203. [[CrossRef](#)]
27. Satpute, S.K.; Banpurkar, A.G.; Dhakephalkar, P.K.; Banat, I.M.; Chopade, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30*, 127–144. [[CrossRef](#)]
28. Fox, J. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *J. Stat. Softw.* **2005**, *14*, 1–42. [[CrossRef](#)]
29. Alves, M.; Campos-Takaki, G.M.; Porto3, A.L.F.; Milanez, A.I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Braz. J. Microbiol.* **2002**, *33*, 325–330. [[CrossRef](#)]
30. De Oliveira Schmidt, V.K.; Carvalho, J.D.S.; De Oliveira, D.; De Andrade, C.J. Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: An overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *37*, 21. [[CrossRef](#)]

Figures supplémentaires

Supplementary Table S1. PMT mean values obtained for 8 *Mucor* spp. grown in 8 different media.

Species	Strain code	Medium							
		BSF1	BSF2	BSF3	BSF4	BSF5	BSF6	BSF7	BSF8
<i>Mucor mucedo</i>	MM1	3.51 ± 0.82 ^{a,AB}	3 ± 0.82 ^{a,BC}	2.17 ± 0.82 ^{c,CD}	2 ± 1.17 ^{a,CD}	4.67 ± 0.55 ^{a,A}	1.17 ± 1.37 ^{b,D}	0.84 ± 0 ^{a,D}	1.5 ± 0 ^{a,CD}
<i>Mucor plumbeus</i>	MP1	3.34 ± 0.84 ^{a,b,A}	3 ± 0.52 ^{a,AB}	3.67 ± 0.82 ^{a,A}	2 ± 0.41 ^{a,BC}	3.84 ± 0.52 ^{a,b,A}	3.33 ± 0.55 ^{a,A}	1.01 ± 0.75 ^{a,C}	1.83 ± 0.52 ^{b,c,C}
<i>Mucor mucedo</i>	MM3	3.67 ± 0.98 ^{a,A}	2.84 ± 0.41 ^{ab,ABC}	2 ± 0.89 ^{ab,BCD}	1.67 ± 0.55 ^{a,CD}	3 ± 0.41 ^{cd,AB}	1 ± 0.75 ^{b,D}	1.17 ± 0.52 ^{a,D}	1.67 ± 0.41 ^{cd,CD}
<i>Mucor lanceolatus</i>	ML2	1.84 ± 0.63 ^{c,BC}	1.17 ± 1.38 ^{c,CD}	2.83 ± 0.41 ^{abcd,AB}	1.5 ± 0.52 ^{a,CD}	3.67 ± 0.55 ^{bc,A}	1.5 ± 0.52 ^{b,CD}	0.51 ± 0.52 ^{ab,D}	1.83 ± 0.52 ^{b,d,BC}
<i>Mucor circinelloides</i>	MC3	1.67 ± 0.98 ^{c,BC}	1 ± 0.52 ^{c,C}	1.67 ± 0.52 ^{ab,BC}	1.67 ± 0.55 ^{a,BC}	3.84 ± 0.52 ^{a,b,A}	0.83 ± 0.63 ^{b,C}	0 ± 0.55 ^{c,D}	2.5 ± 0 ^{ab,B}
<i>Mucor circinelloides</i>	MC1	3.84 ± 0.89 ^{a,A}	1.84 ± 0.41 ^{abc,BC}	2.67 ± 0.52 ^{abcd,B}	1.67 ± 0.55 ^{a,C}	4.17 ± 0 ^{ab,A}	0.5 ± 0.52 ^{b,D}	0 ± 0.41 ^{c,D}	1.5 ± 0 ^{a,C}
<i>Mucor spinosus</i>	MS1	1.67 ± 0.98 ^{c,BC}	1.5 ± 0.75 ^{c,BC}	3.33 ± 0.82 ^{ab,A}	1.5 ± 0.82 ^{a,BC}	2.5 ± 0.52 ^{a,AB}	1.5 ± 0.52 ^{b,BC}	0.51 ± 0.52 ^{ab,C}	2.67 ± 0.75 ^{a,AB}
<i>Mucor racemosus</i>	MR3	1.5 ± 0.52 ^{c,B}	1.67 ± 0 ^{bc,B}	3 ± 0.63 ^{abc,A}	1.34 ± 0.41 ^{a,B}	3.17 ± 0.63 ^{cd,A}	1.33 ± 1.52 ^{b,B}	1.34 ± 0.55 ^{a,B}	2.33 ± 0.41 ^{a,b,AB}

* , Strain effect on PMT values for each medium: values with different letters (small letters a, b, c and d) in a column are significantly different by Tukey's HSD test ($P<0.05$); Medium effect on PMT values for each strain: values with different letters (capital letters A, B, C and D) in a column are significantly different by Tukey's HSD test ($P<0.05$).

Supplementary Table S2. OST mean values obtained for 8 *Mucor* spp. grown in 8 different media.

Species	Strain code	Medium							
		BSF1	BSF2	BSF3	BSF4	BSF5	BSF6	BSF7	BSF8
<i>Mucor mucedo</i>	MM1	7.17 ± 0.58 ^{a,AB}	5.67 ± 1.59 ^{ab,BC}	5.33 ± 0.76 ^{ab,BC}	7.33 ± 0.29 ^{a,AB}	8.1 ± 0.36 ^{a,A}	0.7 ± 0.52 ^{c,D}	3.67 ± 0.29 ^{b,C}	4.5 ± 0.5 ^{a,C}
<i>Mucor plumbeus</i>	MP1	7.87 ± 0.12 ^{a,A}	7.67 ± 0.29 ^{a,AB}	4.2 ± 0.61 ^{bcdD}	7.33 ± 0.29 ^{a,AB}	7 ± 0.5 ^{a,ABC}	6.83 ± 0.76 ^{a,ABC}	5.83 ± 0.76 ^{a,C}	6.33 ± 0.29 ^{a,BC}
<i>Mucor mucedo</i>	MM3	8.33 ± 0.29 ^{a,A}	4.47 ± 0.42 ^{b,c,C}	5.83 ± 0.58 ^{a,BC}	7.33 ± 0.29 ^{a,AB}	7.83 ± 0.29 ^{a,A}	1.5 ± 0.5 ^{c,D}	2 ± 0.5 ^{c,D}	2.67 ± 1.26 ^{b,c,D}
<i>Mucor lanceolatus</i>	ML2	1.33 ± 1.26 ^{b,c,CD}	3.83 ± 0.15 ^{b,C}	1.33 ± 0.29 ^{e,CD}	7.03 ± 0.4 ^{a,B}	7 ± 0 ^{a,A}	0 ± 0 ^{c,D}	1.67 ± 0.5 ^{a,C}	1.5 ± 0.5 ^{c,d,D}
<i>Mucor circinelloides</i>	MC3	3.5 ± 0.5 ^{b,BC}	0.53 ± 0.92 ^{a,D}	3.17 ± 0.29 ^{d,BC}	7.07 ± 0.12 ^{a,B}	7.33 ± 0.29 ^{a,A}	2.67 ± 0.29 ^{b,C}	4.5 ± 1.32 ^{a,B}	0.67 ± 0.29 ^{a,D}
<i>Mucor circinelloides</i>	MC1	8.17 ± 0.58 ^{a,A}	3.27 ± 0.64 ^{c,B}	3.5 ± 0.5 ^{c,d,B}	7.17 ± 0.29 ^{a,B}	8 ± 0.5 ^{a,A}	0 ± 0 ^{c,C}	3 ± 1 ^{b,c,B}	3.17 ± 1.04 ^{b,C}
<i>Mucor spinulosus</i>	MS1	1.7 ± 0.66 ^{b,c,CD}	1.23 ± 0.25 ^{d,CD}	0.5 ± 0.5 ^{e,CD}	6.53 ± 0.15 ^{b,A}	4.17 ± 0.58 ^{b,B}	2.67 ± 1.53 ^{b,BC}	2.17 ± 0.58 ^{c,BCD}	3 ± 0.5 ^{b,c,BC}
<i>Mucor racemosus</i>	MR3	0.83 ± 1.44 ^{c,D}	4.63 ± 0.06 ^{b,c,BC}	4.83 ± 0.58 ^{a,b,B}	6.67 ± 0.29 ^{a,B}	7.1 ± 0.36 ^{a,A}	0.33 ± 0.29 ^{c,D}	3 ± 0.5 ^{b,c}	5.67 ± 0.58 ^{a,AB}

^{*}, Strain effect on OST values for each medium: values with different letters (small letters a, b, c, d and e) in a column are significantly different by Tukey's HSD test ($P<0.05$); Medium effect on OST values for each strain: values with different letters (capital letters A, B, C and D) in a column are significantly different by Tukey's HSD test ($P<0.05$).

CHAPITRE II : Diversité fongique et champignons producteurs de bio-tensioactifs dans des environnements contaminés aux hydrocarbures

I- Résumé des travaux

Suite à l'étude conduite sur les *Mucor* spp., une étude de plus grande envergure a été conduite. Cette seconde étude avait pour objectifs (i) d'explorer la diversité fongique associée à des sites contaminés aux hydrocarbures et (ii) d'étudier le potentiel de production de bio-tensioactifs chez les champignons présents dans ces environnements.

Comme présenté dans l'introduction bibliographique, la biodégradation des hydrocarbures par des microorganismes est facilitée par la présence de tensioactifs. Ainsi, si des microorganismes parviennent à se développer dans des environnements contaminés aux hydrocarbures, ceux-ci doivent potentiellement être en capacité de produire ce type de molécules. Quatre sites ont été sélectionnés (i) la plage du Cedre, qui est une plage artificielle où du pétrole est volontairement déversé afin d'y enseigner les méthodes de dépollution, (ii) le port de Brest, où les flux de navires sont importants, et où des déversements d'hydrocarbures ont eu lieu, (iii) la Penfeld, cours d'eau traversant Brest, qui reçoit les eaux de pluie de la ville de Brest et enfin, (iv) l'Ile-Grande, qui abrite en son schorre des contaminations de pétrole de l'*Amoco Cadiz*. Des sédiments et de l'eau ont été échantillonnés en hiver et en été à partir quatre sites. Les échantillons récoltés ont été analysés de manière directe, par étalement, et un enrichissement dans un bouillon de culture supplémenté en diesel a également été effectué. Des isolements ont été réalisés et ont conduit à l'obtention de 701 isolats. Ces isolats ont été cultivés dans 2 milieux liquides (BSF5 et Kavadia) à l'aide d'un système de culture miniaturisée qui permet la culture en aérobiose en plaques de 24 trous. Les surnageants récupérés ont ensuite été criblés via les deux tests utilisés dans la précédente étude : l'OST et le PMT. Parmi les 701 isolats, 179 isolats ont présenté des activités sur au moins un des deux tests, incluant des isolats avec de fortes activités. Tous les isolats positifs ont été identifiés par séquençage d'un gène d'intérêt taxonomique. Ceux-ci appartenaient à 3 phyla, 49 genres et 83 espèces.

La diversité fongique a été étudiée par une approche culture-indépendante (metabarcoding), sur tous les échantillons et aux deux périodes. Ces communautés fongiques étaient diversifiées et les principaux taxons appartenaient aux genres *Cladosporium*, *Penicillium*,

Pseudeurotium, *Phoma*, *Aspergillus* et *Trichoderma*, et aux genres *Ochroconis*, *Fusicolla* et *Aureobasidium* dans certains sites spécifiques.

En conclusion, cette étude a démontré que la production de molécules tensioactives était répandue chez les champignons provenant d'environnements contaminés aux hydrocarbures et elle a permis de sélectionner différents isolats ayant des activités de surface prometteuses.

Les mises en culture et le criblage des isolats échantillonnés au Cedre ont fait l'objet du stage de Master 1 de Lydia Hamouche.

Les analyses GC-MS des échantillons de sédiments ont été réalisées au Cedre par Justine Receveur.

II- Article soumis à *Journal of Applied Microbiology*

Chotard M, Lucchesi ME, Hamouche L, Tréguer S, Lelchat F, Le Floch S, Mounier J. Fungal diversity and surfactant-producing fungi in oil contaminated environments. Soumis à *Journal of Applied Microbiology*. 2022

Fungal diversity and surfactant-producing fungi in oil contaminated environments

Mélanie Chotard^{1,2}, Marie-Elisabeth Lucchesi¹, Lydia Hamouche¹, Sylvie Tréguer¹, Florian Lelchat^{2,3}, Stéphane Le Floch², Jérôme Mounier^{1*}

¹Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

²Cedre, 715 rue Alain Colas, Brest, France

³Leo viridis, 245 rue René Descartes, 29280, Plouzané, France

*corresponding author: phone: +33 290915121, fax: +33 290915101, email: jerome.mounier@univ-brest.fr

Abstract

Aims: To investigate fungal diversity and biosurfactant-producing fungi in four oil-contaminated sites.

Methods and results: Water and sediment samples were collected from four sites in Brittany (France), over two periods, in winter/spring and summer. Fungal diversity was investigated using a metagenetic approach targeting the ITS2 region. Surface-active compound production of 701 fungal isolates collected from these samples after direct plating or following enrichment was assessed using oil spreading and Parafilm M tests. Fungal communities were highly diverse and the main dominant fungal taxa were members of the *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Phoma*, *Aspergillus* and *Trichoderma* as well as *Ochroconis*, *Fusicolla* and *Aureobasidium* genera in specific sites. One hundred and seventy nine isolates (25.5% of total isolates) were positive to at least one of the screening tests while 105 were positive to the 2 two tests. Major genera among positive isolates were *Fusarium*, *Trichoderma*, *Candida* and *Penicillium* spp. Six isolates belonging to *Aureobasidium pullulans*, *Mucor griseocyanus*, *Trichoderma citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *Diaporthe eres* showed promising activities.

Conclusions: The present study highlighted the fungal diversity of oil-contaminated environments and the fact that surface-active compound production is widespread in fungi originating from these habitats.

Significance and impact of study: This is the first time that the link between fungal diversity in oil-contaminated environments and production of surface-active compounds is demonstrated. Oil-contaminated environments may be an untapped resource for surfactant-producing fungi with potential biotechnological interest.

Keywords : fungi, biosurfactant, diversity, oil-contaminated

1. Introduction

Surfactants are amphiphilic molecules which reduce tension at phase interfaces, have emulsifying activities and can help in gel and foam stabilization (Wan *et al.*, 2016). Because of these properties, they have a wide range of applications in various sectors including the pharmaceutical, cosmetic, and food industries (Forgiarini *et al.*, 2021). Furthermore, surfactants are also used as a component of dispersants which play an important role in oil spill cleanup (Freitas *et al.*, 2016).

Conventional surfactants are derived or manufactured using petrochemicals and because of environmental concerns and increased consumer awareness, “biosurfactants” also called “green surfactants” or “renewable surfactants” made or derived from renewable resources and/or waste substrates are becoming more and more popular to replace existing conventional surfactants due to their supposed low toxicity and high biodegradability (Banat *et al.*, 2010; Bordas & Lafrance, 2001). These surface-active compounds are mainly produced by microorganisms including bacteria and fungi. They can be differentiated by their molecular weight and structure and are divided into two groups, those with low molecular weight also termed biosurfactants (e.g., glycolipids, trehalose lipids, lipopeptides) and those with high molecular weight also termed bioemulsifiers (e.g., lipoproteins, lipopolysaccharides, exopolysaccharides and proteins) (Bami *et al.*, 2022; Jahan *et al.*, 2020). Glycolipids including rhamnolipids, sophorolipids and mannosylerythritol lipids (MEL) are probably the best known biosurfactants, all of which being available on the market (Akbari *et al.*, 2018; Desai & Banat, 1997).

Among bacterial surfactant producers, *Pseudomonas aeruginosa* is the most efficient rhamnolipid producer (Soberón-Chávez *et al.*, 2021) while *Bacillus* species are well known for their ability to produce surfactins which belong to the lipopeptide family (Moutinho *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2006). Other surfactant-producing bacteria include for example *Arthrobacter*, *Alcanivorax* and *Brevibacterium* spp. which produce trehalolipids and exopolysaccharides (emulsan), glycolipids, and lipopeptides, respectively (Dell'Anno *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2007). In recent years, an increasing number of publications have also highlighted surfactant production in fungi mostly belonging to the *Ascomycota* phylum. Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* has been investigated to a great extent (Bhardwaj *et al.*, 2013; Claus & Van Bogaert, 2017) while other species such as *Aspergillus flavus*, *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium chrysogenum* and *Trichoderma* have also been shown to produce diverse surface-active molecules, i.e., glycosides, trehalolipids, lipopeptides,

hydrophobins and lipopeptides, respectively (Linder *et al.*, 2001; Luft *et al.*, 2020; Piegza, Pietrzykowska, *et al.*, 2021). In other fungal phyla, Basidiomycota such as *Ustilago maydis* (Liu *et al.*, 2011) and Mucromycota such as *Mortierella alpina* (Baldeweg *et al.*, 2019) and *Mucor* spp. (Chotard *et al.*, 2022) have also been identified as surfactant-molecule producers. Surfactant-producing fungi are encountered in various habitats including soil, plants and animals (da Silva *et al.*, 2021) but also extreme environments such as heavily polluted environments (Singh *et al.*, 2017). These environments can be natural reservoirs of fungi with interesting biotechnological and/or bioremediation potential (Norton, 2012). Concerning specifically fungal biosurfactants, in a recent study by Yalçın *et al.* (2018), activated sludges and soil samples from automobile workshops were found to be a reservoir of surfactant-producing yeasts (Yalçın *et al.*, 2018). More recently, Maamar *et al.* (2020) isolated marine *Penicillium* spp. from hydrocarbon-polluted sites in the Oran Port in Algeria with interesting surfactant production potential (Maamar *et al.*, 2020). Various studies (Hasani zadeh *et al.*, 2018; Othman *et al.*, 2022; Qazi *et al.*, 2014) have also characterized surface-active compounds of individual fungal strains which were isolated from oil-contaminated environments.

In this context, the aim of the present study was i) to investigate, using a metagenetic approach, the fungal diversity encountered in water and sediment samples originating from 4 oil-contaminated sites in Brittany (France) and collected at two different seasons (winter and summer) and ii) to assess surface-active compound production of a large collection of fungal isolates collected from these samples after direct plating or following enrichment.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and sample collection

Sampling was carried out at 4 sites in Brittany (France), (i) Cedre (ii) Penfeld (iii) Ile-Grande and (iv) Brest harbor (Fig. 1) over two periods, in winter/spring (January to April 2019) and summer (July 2019). These sites were selected because of suspected chronic oil contamination. The Cedre facility has an artificial beach used to train spill responders and oil is discharged on this facility on a regular basis. The Penfeld sampling site was chosen because it corresponds to a river that receives the rainwater of the city of Brest. The harbor of Brest (formerly named Gesocribate, founded by the Roman Empire circa 270) is one of the oldest military harbors still in operation in the world and has a subsequent long history of maritime traffic and wars with regular accidental releases of hydrocarbons. Ile Grande sampling site

corresponds to a beach on the north coast of Brittany where part of the collected waste was buried during the clean-up operations following the *Amoco Cadiz* oil spill accident (1978). A total of 30 samples were collected, including 12 water samples and 18 sediment samples, following ISO 5667-19:2005-03 and ISO 19458:2006-11 standards for sediment and water sampling, respectively. Sediments were collected with a 20-cm diameter PVC corer at a depth of 30 cm while water from the subsurface was collected in a sterile 2-L Schott bottle at a depth between 20 and 40 cm. Following sample collection, they were kept at 4°C and culture-dependent microbiological analyses performed within the next 24h. For metataxonomic analysis, sediment samples were directly stored at -20°C while for water samples, 2 L of each sample were filtered on 0.45-µm cellulose acetate filters (Grosseron) and filters kept at -20°C until DNA extraction as described below. In addition, sample physico-chemical characteristics (pH, salinity, water temperature, redox and oximetry) were measured on-site and samples kept at -20°C for the determination of their hydrocarbon patterns after sediment extraction, followed by GC-MS analyses of the extracts, as described below.

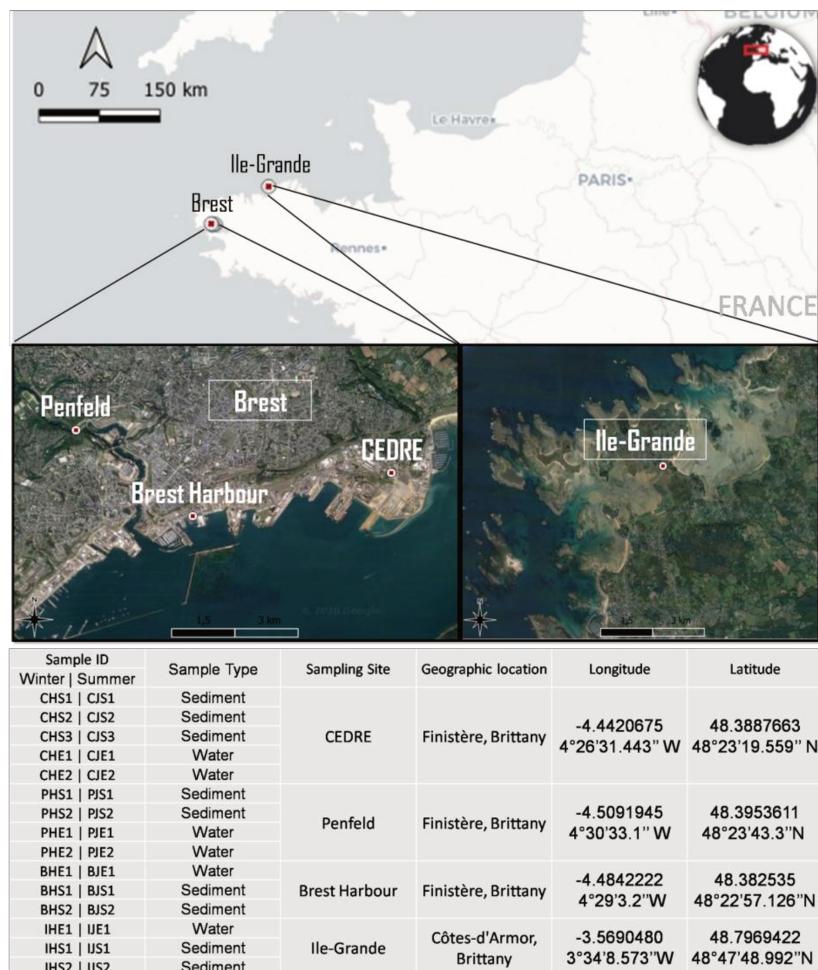


Fig 1. Sampling location map and associated coordinates

2.2. Microbiological analyses

2.2.1. Enumeration of fungi

For sediment samples, 10 g were aseptically transferred in 90 mL of saline solution (0.85% NaCl). Water samples (1 mL) were serially diluted directly. Then, 0.1 mL of each dilution was plated onto Potato Dextrose Agar (PDA) and Sabouraud agar (g/L : meat peptone 10, glucose 20, agar 15) supplemented with 3% sea salts (Sigma, Saint-Louis, USA), previously autoclaved at 121°C for 15 min. Both media were supplemented with filter-sterilized penicillin G (200 mg/L) and chloramphenicol (500 mg/L) solutions prior to plate-pouring.

2.2.2. Enrichment culture

An enrichment culture was also performed for all samples. For this, 10 mL of water or 10 mL of the homogenized sediment sample were inoculated into 90 ml of modified Sabouraud broth (5 g/L glucose, 3% sea salts, 1% diesel B7) supplemented with penicillin G (200 mg/L) and chloramphenicol (500 mg/L) in 250-mL Erlenmeyer flasks and incubated for 15 days at 25°C under agitation at 120 rpm. After incubation, the enrichment culture was serially diluted and plated onto PDA and Sabouraud media as described above.

2.2.3. Isolation of fungi

After 15 days of incubation, between 5 and 10 colonies/thalli presenting different morphotypes were selected from countable plates (total of 701 isolates) and purified by restreaking twice. Spores were recovered from purified isolates using 0.01% Tween 80 and then centrifuged while yeast cells were directly scraped from agar plates. After suspension in 15% glycerol, enumeration using a Malassez cell and standardization to 3.6×10^6 cells or spores/mL, isolates were then stored at -80°C in 15% glycerol .

2.3. Screening and identification of surfactant-producing fungi

2.3.1. Media and growth conditions

Cultures of each fungal isolate were carried out in duplicate in 24-square polypropylene deep well plates using the Duetz-MTPS system (Enzysscreen, Heemstede, Netherlands). Each well which contained 2.5 mL of BSF5 medium (g/L : rapeseed oil 20, glucose 5, yeast extract 5 and sea salts 30) or Kavadia medium (g/L : glucose 80, sea salts 30, yeast extract 3, KH_2PO_4

7, Na₂HPO₄.2H₂O 2.5, MgSO₄.7H₂O 1.5, CaCl₂.2H₂O 0.1, FeCl₃.6H₂O 0.008, ZnSO₄.7H₂O 0.001, CuSO₄.5H₂O 0.0001, CoSO₄.7H₂O 0.0001, MnSO₄.H₂O 0.0001) was then inoculated with 50 µL of standardized fungal stocks. Then, deep well plates topped with a sandwich cover were mounted on a New Brunswick™ Innova® 44 shaker (Eppendorf, Hamburg, Germany) using a clamp system and incubated at 25°C for 7 days (filamentous fungi) or 3 days (yeasts), under agitation at 175 rpm. After incubation, the culture broth was centrifuged twice at 9000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant kept at -20°C until further use.

2.3.2. Detection of surface-active compounds in supernatants

Parafilm M test (PMT) and Oil spreading test (OST) were applied to detect surface-active compounds in the supernatants derived from 701 isolates cultivated in the 2 media described above. Each test was performed in triplicate.

PMT was performed as described previously (Yalçın *et al.*, 2018). Briefly, 15 µL of supernatant were deposited on parafilm (Parafilm M®, Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA), previously fixed on graph paper. Then, photos were taken and drop areas were measured by image processing using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012). Uninoculated media and distilled water were used as negative control, and 10% SDS as positive control.

OST was performed as described previously (Morikawa *et al.*, 2000) with slight modifications. Briefly, 25 mL of distilled water were placed in a 9-cm-diameter polystyrene Petri dish. Then, 15µL of crude oil (Rebco, Cedre) were deposited on the water surface in the Petri dish center. After 2 minutes, 15 µL of supernatant were placed on the oil surface. OST was considered as positive when a halo was observed on the surface, indicating the presence of surface active compounds in the CFS. SDS 20% and distilled water were used as positive and negative control, respectively. Photos were taken and repulsion halos areas measured by image processing using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012).

2.3.3. Identification of potent surfactant producer

After a preliminary identification at the genus level using macroscopic observations, isolates positive to at least one of the two tests were identified by sequencing of a gene of taxonomic interest. DNA was extracted from pure cultures with MagMAX™ kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and KingFisher Duo Prime automatic extraction machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) following the manufacturer's

instructions. DNA quality and quantity were then verified using a Nanodrop spectrophotometer, diluted to 20 ng/ μ L and stored at -20°C until further use.

Yeasts were identified after amplification of the D1-D2 domain using the NL1/NL4 primers (Kurtzman & Robnett, 1997). Filamentous fungi were identified after amplification of either the internal transcribed spacer (ITS) region (all fungi except *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Cladosporium* spp.) using ITS4/ITS5 primers (White *et al.*, 1990), the partial β tubulin gene (*Penicillium* and *Aspergillus* spp.) using Bt2a/Bt2b primers (Glass & Donaldson, 1995), the partial elongation factor α gene (*Fusarium* spp.) using EF1-f/EF1-r primers (O'Donnell *et al.*, 1998) and the partial actin gene (*Cladosporium* spp.) using ACT-512F/ACT-783R primers (Carbone & Kohn, 1999). Sequencing was performed by Eurofins platform (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) using the same primers.

The sequences were then assembled into contigs using DNA Baser software and compared with the GenBank database using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, accessed on December 28, 2021) (Altschul *et al.*, 1990) and with reference databases from Mycobank using the pairwise alignment (https://www.mycobank.org/page/Pairwise_alignment, accessed on December 28, 2021) for assignment to the closest known relatives.

2.4. Metataxonomic analysis of fungal communities

2.4.1. DNA extraction

Total DNA extractions were performed in triplicate using NucleoSpin™ Soil kit (Macherey-Nagel™) on 500 mg sediments or from portions of one filter previously cut under sterile conditions for water samples. Extraction and purification steps were performed as recommended by the manufacturer's instructions, except that an enzymatic lysis step was first performed with 0.5 U/ μ L lyticase (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), at 37°C for 2 h. DNA quality and quantity were finally verified using a Nanodrop spectrophotometer.

2.4.2. PCR and metagenetic sequencing conditions

To study fungal diversity, primers ITS3f/ITS4_Kyo1 were used to amplify the ITS2 region according to the PCR conditions described by Toju *et al.* (2012). Sequencing of ITS2 amplicons was carried out in the same run at the Genome Quebec platform (MacGill University, Montreal, Canada) using Illumina Miseq PE300 technology generating 2x300 bp reads.

2.4.3. Bioinformatic analysis and taxonomical assignment

After removing primers using Cutadapt (Martin, 2011), the DADA2 library (Callahan *et al.*, 2016) was used in R version 3.5.0 (R Core Team, 2019) for ITS2 reads filtering. Forward and reverse read pairs were trimmed and filtered, with forward reads truncated at 260 bp and reverse reads at 230 bp and at the first quality score of 2, no ambiguous bases allowed and each read required to have less than 2 expected errors based on their quality scores. Amplicon sequence variants (ASVs) were independently inferred from the forward and reverse reads of each sample using the run-specific error rates, and then read pairs were merged requiring at least 12 bp overlap. Prior to chimera filtering, the ITS2 region was extracted using ITSx v1.0.11 (Bengtsson-Palme *et al.*, 2013) and the -t F option to only obtain Fungi sequences. ITS chimera sequences were then removed using UCHIME algorithm (Edgar *et al.*, 2011) implemented in VSEARCH v1.1.3 (<https://github.com/torognes/vsearch>) against the ChimeraSlayer reference database (Haas *et al.*, 2011) and UCHIME reference dataset version 7.2 (Nilsson *et al.*, 2019), respectively. Then, the OTU calling program dbOTU plug-in in QIIME2 was used to create ASV from closely related and similarly distributed sequences (Olesen *et al.*, 2017). BLAST algorithm was finally used for taxonomic assignment, which was made with UNITE plus INSD non-redundant ITS database version 8.3 (UNITE Community, 2019). Taxonomic assignments were manually checked with the GenBank database using BLAST and with reference databases from Mycobank using the pairwise alignment as described above. Multi-affiliated ASVs at the species level were only assigned to the genus level. ASVs with less than 90 reads and present in less than 2 samples were not considered and filtered from the ASV table.

2.4.4. Biodiversity and Statistical analysis

Biostatistical analyses were performed using MicrobiomeAnalyst (Chong *et al.*, 2020; Dhariwal *et al.*, 2017). Parameters were set with a minimum count of 2 and with 10% of prevalence in samples, with a variance filter of 10% based on inter-quantile range. Data were then rarefied to the minimum library size and transformed using centered log-ratio. Abundances, alpha and beta diversities were analyzed with the MicrobiomeAnalyst web platform.

2.5. Physico-chemical analysis

2.5.1. pH, water temperature, salinity and redox and oximetry measurements

Water temperature, pH and oxido-reduction measurements were carried out on site, by immersing a multimeter probe (Odeon, Neotek-Ponsel) in water. Oximetry was also measured on site, by immersing an oximeter probe in water (Oxi 330i, WTW). Salinity measurements were performed using a refractometer (S/Mill-E, Atago).

2.5.2. Quantification of present hydrocarbons by Gas Chromatography coupled to Mass spectrometry (GC-MS)

Sediments from each sampled site were collected during the campaigns in 50 mL-Falcon tubes and stored at 4°C awaiting analysis. Total petroleum hydrocarbon (TPH), 21 PAH, among which the 16 listed as priority pollutants by US EPA (Keith, 2015), 25 alkylated families and n-alkanes were quantified in sediment samples.

Approximately 10 g of sediment (wet weight) were spiked with internal standards (perdeuterated PAHs and eicosane) and extracted by ASE (Accelerated Solvant Extraction) (Dionex ASE 350, ThermoFisher) with a solution of dichloromethane/acetone (80/20). Extracts were analysed by Gas Chromatography with Mass Spectrometry detection (GC-MS) in selective ion monitoring mode. The GC was an HP 7890 series II (Hewlett-Packard. Palo Alto. CA. USA) equipped with a Multi Mode Injector (MMI) used in the pulsed splitless mode (Pulse Splitless time: 1 min. Pulse Pressure: 15 psi). The injector temperature was maintained at 300 °C. The interface temperature was 300°C. The GC temperature gradient was: from 50°C (1 min) to 320°C (20 min) at 3°C/min. The carrier gas was Helium at a constant flow of 1 ml/min. The capillary column used was a HP 5-ms (Hewlett-Packard.Palo Alto. CA. USA): 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness. The GC was coupled to a HP 7000 triple quadripole used in the Electronic Impact mode (Electronic Impact: 70 eV. voltage: 2000V). TPH, PAHs and *n*-alkanes quantifications were done using Single Ion Monitoring mode with respectively the molecular ion of each compound and a common fragment (generally m/z = 57) at a minimum of 2 cycles/s.

3. Results

3.1. Physico-chemical analysis of collected samples

3.1.1. pH, temperature, salinity, redox potential and oximetry measurements of water samples

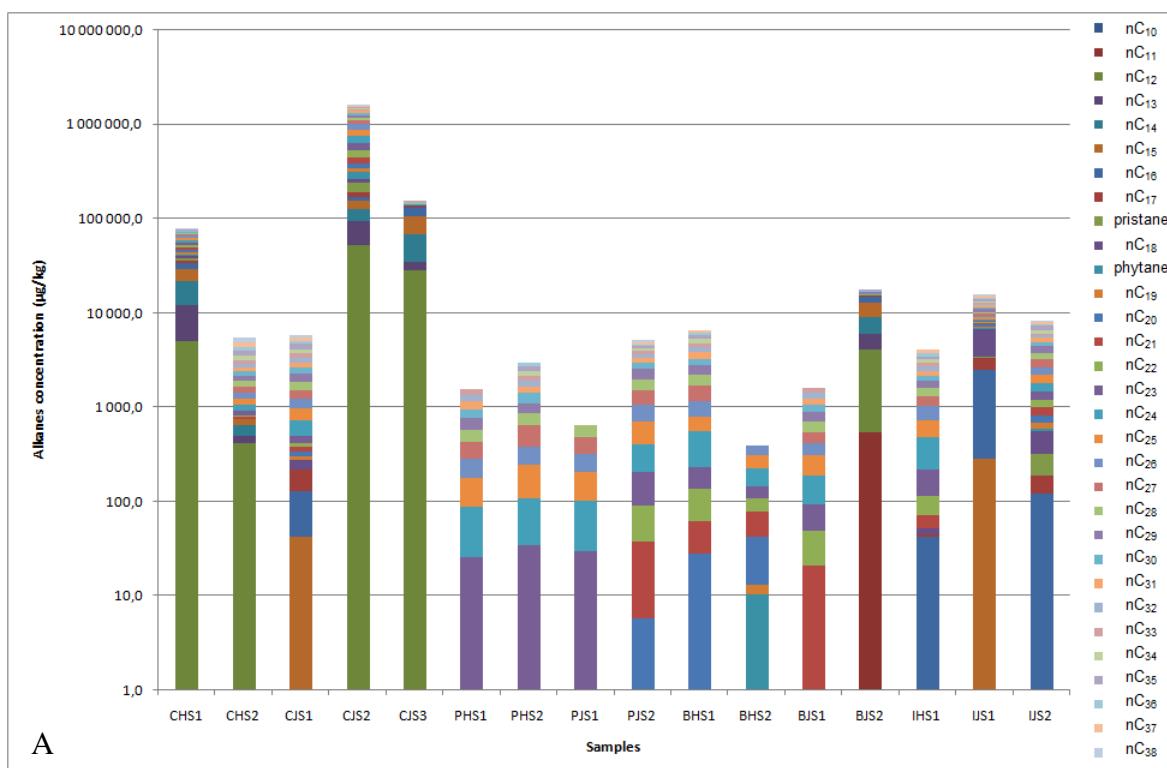
Physico-chemical measurements were performed *in situ*, in order to analyze the differences between sites and between sampling seasons. As shown in Table 1, water pH varied between 6.88 for the Penfeld site in winter to 8.3 for the Cedre site in summer. Salinity also varied from one site to another, with Ile-Grande and Brest harbor showing the highest salinities (2.6-4.0%) and Penfeld site the lowest (0.05%). Most temperatures doubled from one sampling season to another. It tripled for the Cedre sampling site from 8°C in winter to 24°C in summer. The redox potential showed positive values for all sampling sites, varying between 85.5 (Ile-Grande, summer season) to 168.3 mV (Cedre, winter). Dissolved oxygen levels were identical and close to saturation for all sites except for Ile-Grande in winter, which showed 11% of dissolved oxygen.

Table 1. Physico-chemical parameters of water samples

Code	Site	Position	Season	Sampling date	pH	Salinity (g/L)	Redox (mV)	Temperature (°C)	Oxymetry (%)
BHE1	Brest Harbor	1	Winter	08/03/2019	7.35	35	158.5	11.6	100
BJE1	Brest Harbor	1	Summer	02/07/2019	7.54	35	138.8	19.3	99
CHE1	Cedre	1	Winter	24/01/2019	8.6	21	168.3	10.25	78
CHE2	Cedre	2	Winter	24/01/2019	8.06	21	147.3	8.15	100
CHE3	Cedre	3	Winter	24/01/2019	8.11	21	129.6	8.3	100
CJE2	Cedre	2	Summer	09/07/2019	8.3	17	117	24.4	100
CJE3	Cedre	3	Summer	09/07/2019	8	17	137	25.1	100
PHE1	Penfeld	1	Winter	26/02/2019	6.88	0.5	151.3	11.3	100
PHE2	Penfeld	2	Winter	26/02/2019	6.97	0.5	145.1	10.8	96.5
PJE1	Penfeld	1	Summer	16/07/2019	7.2	3	138	21.5	67
PJE2	Penfeld	2	Summer	16/07/2019	7.25	3	147	22	75
IHE1	Ile-Grande	1	Winter	08/04/2019	7.09	26	101.8	12.5	11
IJE1	Ile-Grande	1	Summer	23/07/2019	8.01	40	85.5	26.5	100

3.1.2. Hydrocarbon analysis of sediment samples

GC-MS analysis was used to quantify hydrocarbons, in particular *n*-alkanes (nC₁₀ to nC₃₈) and polycyclic aromatic carbons (PAH) (benzothiophene (BT), chrysene (C), naphtalene (N), biphenyl (B), acenaphthylene (ANY), acenaphtene (ANA), fluorene (F), phenanthrene (P), anthracene (A), dibenzothiophene (D), fluoranthene (FL), pyrene (PY), benzoanthracene (BA), benzofluoranthene (BBF), benzoperylene (BPE)) in sediment samples. Overall, total concentrations of *n*-alkanes ranged from 3.9×10^2 to $1 \times 10^6 \mu\text{g/kg}$ (Figure 2A) with, as expected, the highest hydrocarbon levels in sediments collected from the Cedre artificial beach which was characterized by high nC₁₉ and phytane levels (sample CJS2) and nC₁₄ and nC₁₅ (Sample CJS3) (Fig. 2). Most other sediment samples harbored *n*-alkanes concentrations ranging between 10^3 to $10^4 \mu\text{g/kg}$ with a wide variety of chain length ranging from nC₂₃ to nC₃₈. Noteworthy, within the same site, *n*-alkane composition profiles were quite similar, the only exception being BJS2 and IJS1 samples.



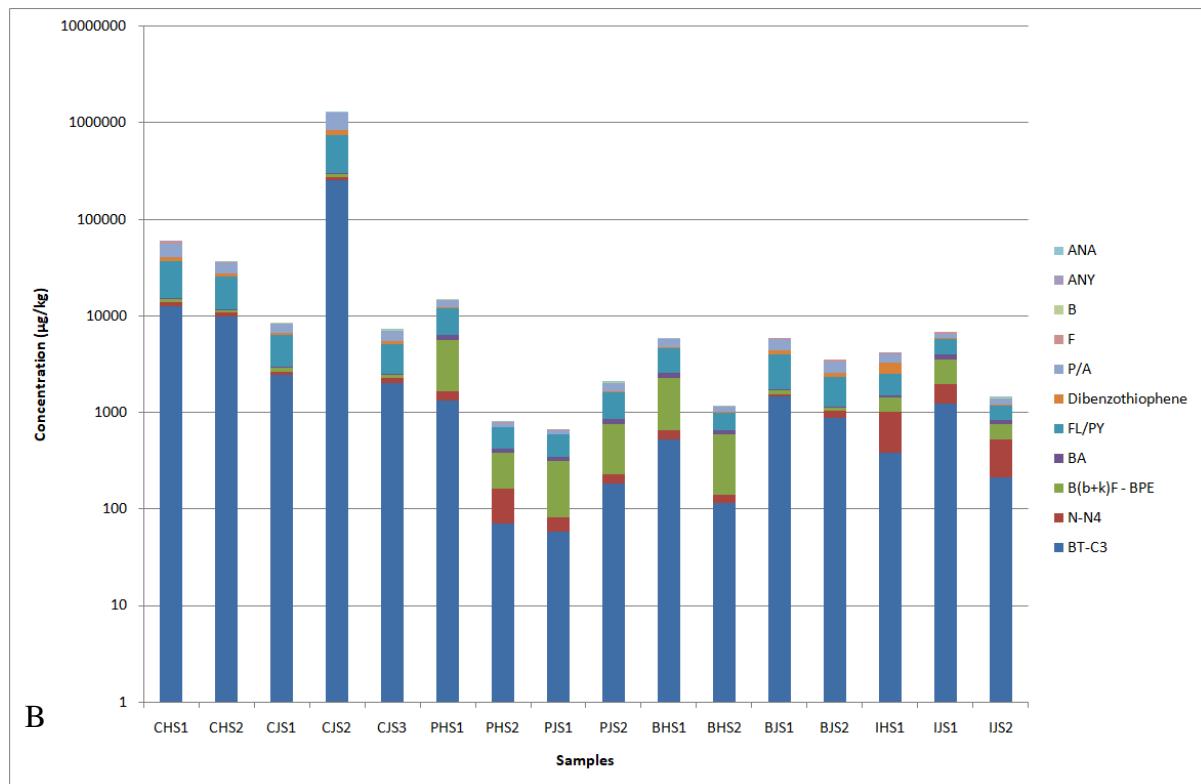


Fig 2. Concentrations of *n*-alkanes (A) and polycyclic aromatic hydrocarbons (B) in sediment samples (C : Cedre, P : Penfeld, B : Brest Harbor, I : Ile-Grande ; H : Winter, J : Summer)

Concerning PAH and as observed for *n*-alkanes, these molecules were the most abundant in Cedre sediment samples (total concentration of 59564 µg/kg (CHS1), 36657 µg/kg (CHS2), 8584 µg/kg (CJS1), 1322912 µg/kg (CJS2) and 7266 µg/kg (CJS3) (Figure 2B). In the latter samples, all PAH classes could be found with high concentrations of benzothiophenes, chrysenes, fluoranthene and pyrene. Benzothiophene and chrysene (BT-C) were detected in all samples with concentrations ranging from 90 to 2.6×10^5 µg/kg.

3.2. Fungal populations by culture-dependent analysis

Fungal populations, as determined by plating on PDA and Sabouraud agar, in sediment and water samples across sampling sites are shown in Table 2. Concerning the agar medium used, fungal populations were generally higher on PDA than Sabouraud agar, except for PHS1, PHS2 and BHS2 samples. Independently of the studied site, fungal populations on PDA ranged between 4 and 3.7×10^3 CFU/mL, and <1 and 3.8×10^4 CFU/g for water and sediment samples, respectively. They were generally higher in sediment (mean counts of $4 \times 10^3 \pm 8.7 \times 10^3$) than in water (mean counts of $5.6 \times 10^2 \pm 1 \times 10^3$) samples with the exception of CHE1

and IJE1 water samples. Concerning the sampling season, fungal abundances were generally higher in summer than winter samples within each site.

Table 2. Fungal populations (CFU/g or CFU/mL for sediment and water samples, respectively) in the different samples after plating on potato dextrose agar (PDA) or Sabouraud agar (SAB).

Site	Season	Sample	Sample type	PDA	SAB
Cedre	Winter	CHE1	Water	4.21×10^2	1.10×10^2
		CHE2	Water	3.00×10^1	1.70×10^1
		CHS1	Sediment	2.00×10^2	1.70×10^2
		CHS2	Sediment	6.70×10^2	6.30×10^2
		CHS3	Sediment	6.90×10^2	5.80×10^2
	Summer	CJE2	Water	3.62×10^2	1.00×10^1
		CJE3	Water	4.55×10^2	1
		CJS1	Sediment	3.75×10^4	7.50×10^1
		CJS2	Sediment	2.42×10^3	5.40×10^2
		CJS3	Sediment	6.25×10^2	1.90×10^2
Penfeld	Winter	PHE1	Water	1.50×10^1	2.80×10^1
		PHE2	Water	1.20×10^1	5
		PHS1	Sediment	1.34×10^3	1.50×10^3
		PHS2	Sediment	1.26×10^3	1.49×10^3
	Summer	PJE1	Water	5.73×10^2	1.00×10^1
		PJE2	Water	1.14×10^3	3.20×10^1
		PJS1	Sediment	8.95×10^3	1.75×10^3
		PJS2	Sediment	4.64×10^3	1.81×10^3
Brest Harbor	Winter	BHE1	Water	4	5
		BHS1	Sediment	3.50×10^1	3.50×10^1
		BHS2	Sediment	8.55×10^2	8.75×10^2
	Summer	BJE1	Water	3.30×10^1	<1
		BJS1	Sediment	5.85×10^2	1.15×10^2
		BJS2	Sediment	2.07×10^3	8.55×10^2
Ile Grande	Winter	IHE1	Water	1.90×10^1	1.50×10^1
		IHS1	Sediment	<1	<1
		IHS2	Sediment	7.50×10^1	8.00×10^1
	Summer	IJE1	Water	3.68×10^3	8.00×10^1
		IJS1	Sediment	3.87×10^3	1.50×10^1
		IJS2	Sediment	5.95×10^3	9.00×10^1

3.3. Fungal diversity in sediment and water samples

The ITS2 metagenetic analysis yielded a total of 744,111 quality-filtered fungal sequences which were clustered into 696 OTUs. Samples with less than 1,000 reads were excluded from the analysis yielding a total of 59 and 9 sediment and water samples, respectively.

Noteworthy, sample datasets with low fungal read numbers harbored high algae read numbers indicating non-specific amplification.

Concerning alpha-diversity measures in the different samples, richness ranged from 2 to 309, the Chao1 index ranged from 2 to 309, the Shannon index from 0.3105 to 4.7170 and Simpson's index of diversity from 0.0844 to 0.9843 (Figure S1). Comparison of alpha diversity indices across categorical variables (sampling site, season, sample type) showed that richness ($p<0.001$), Chao1 ($p<0.001$), Shannon ($p<0.001$) and Simpson ($p<0.01$) index were significantly different according to sampling sites with Penfeld site showing the highest values. Concerning sample types, Shannon ($p<0.05$) and Simpson ($p<0.01$) values were significantly higher in water than in sediment samples.

Fungal communities in sediment samples were dominated by Ascomycota (89%) followed by Basidiomycota (7%), Rozellomycota (3%) and Chytridiomycota (1%). Water samples were also largely dominated by Ascomycota (89%) followed by Basidiomycota (7%), Chytridiomycota (3%) and Rozellomycota (1%). Figure 3 shows the top 30 genera found at the different sites according to sample types (see Figure S2 for detailed results of each sample). Overall diversity at the genus level was high with 22 and 12 genera at relative abundances $>1\%$ in sediment and water samples, respectively. Sediments collected in Penfeld, Ile Grande and Brest harbor had quite similar dominant fungal taxa with dominance of *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Phoma*, *Aspergillus* and *Trichoderma* spp. In addition to the latter genera, Cedre sediment fungal communities were dominated by *Ochroconis* (25%) as well as *Chaetomium*, *Debaryomyces* and *Emericellopsis*. While water samples from Cedre sampling site harbored the same dominant fungal taxa as Cedre sediments with the exception of *Fusicolla* and *Aureobasidium* that were also present at high relative abundances in water samples, those from Penfeld were dominated by *Vibrissa*, *Fusicolla*, *Candida* and *Phoma* genera. Noteworthy, a large proportion of genera (i.e., ~65%), detected in Penfeld water samples, were not part of the top 30 genera shared between sampling sites and sample types.

Beta-diversity among water and sediment fungal communities was investigated using PCoA based on Bray–Curtis distances followed by variance analysis of these distances by permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). At the ASV level, sampling site was the main factor which significantly shaped fungal community structure ($p<0.001$; $R^2=0.21178$) (Figure 4) and to a lower extent, sample type ($p<0.001$; $R^2=0.081372$) and season ($p<0.002$; $R^2=0.039109$). Univariate analysis using T-test and an FDR correction for

multiple testing found 30 ASV, 39 species, 31 genera and 20 families significantly associated to sampling site while 12 ASV, 15 species, 16 genera and 11 families were found to be significantly associated to sample type. The most abundant genera associated with sampling site and sample type are depicted in Figure S3A and S3B.

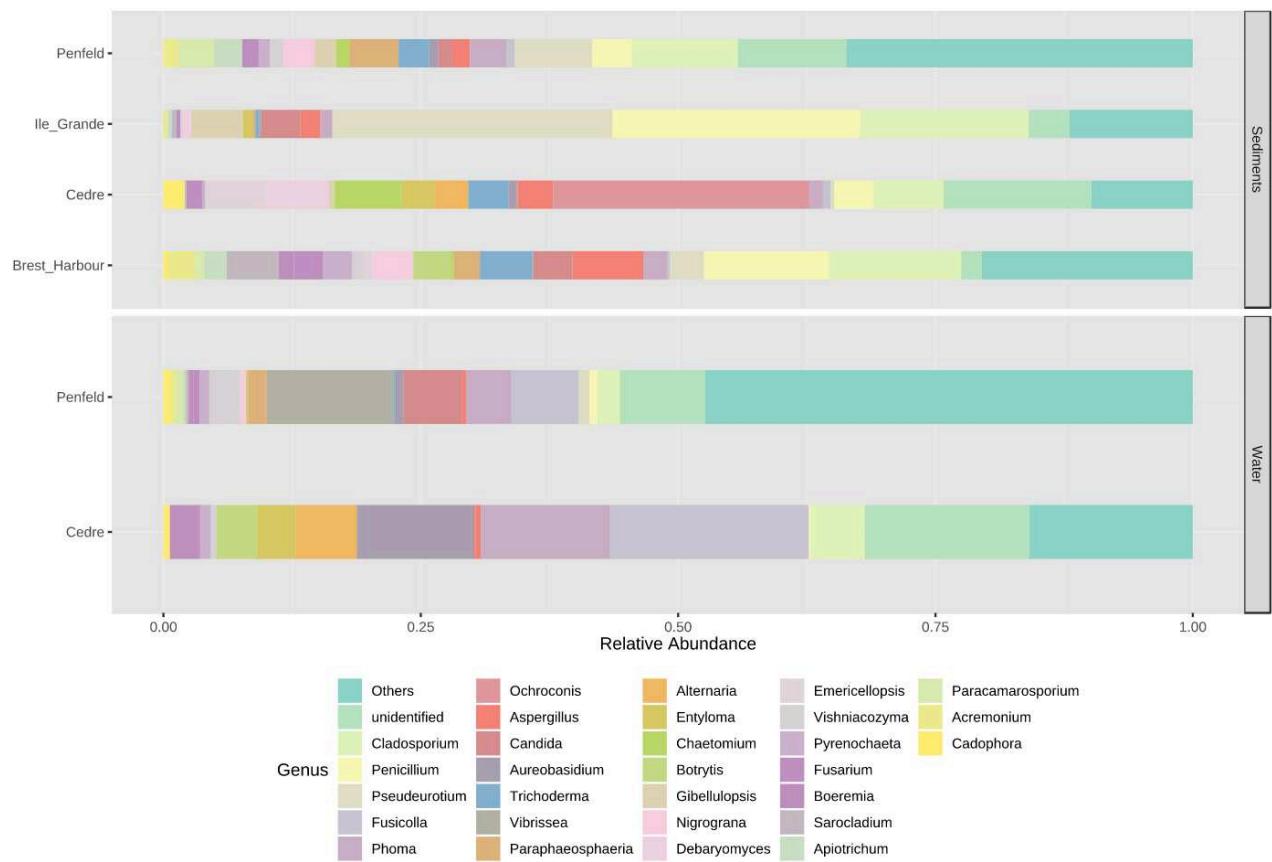


Fig 3. Relative abundances of the top 30 fungal genera according to sites and sample types

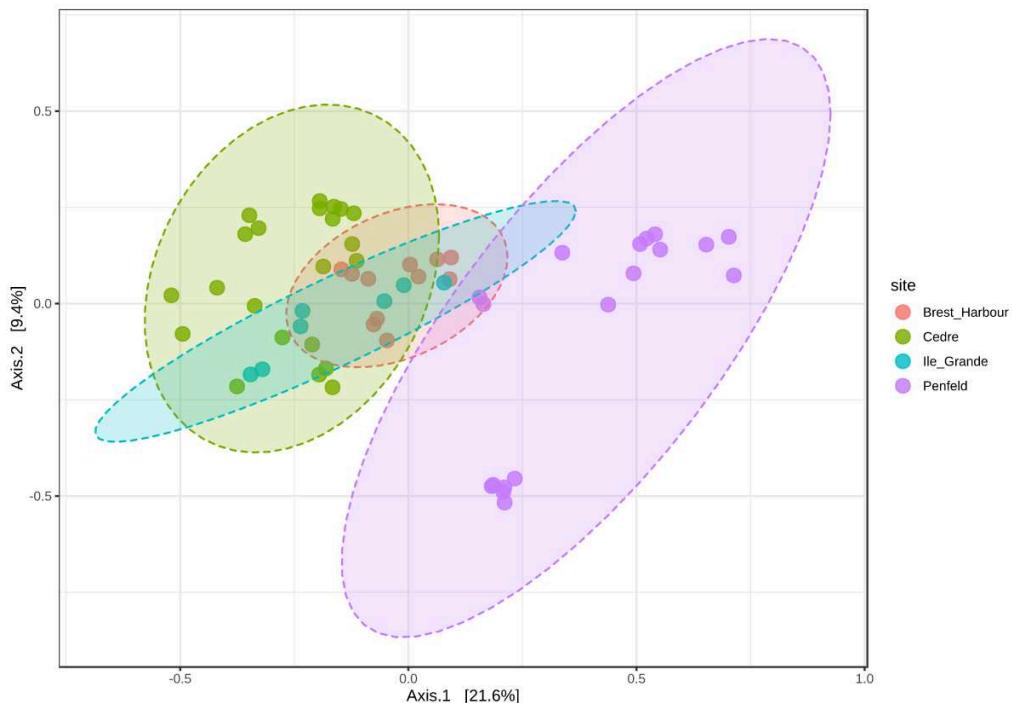


Fig 4. Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distances of fungal communities in each sampling site.

3.4. Fungal diversity in sediment and water samples

A total of 701 isolates were collected and screened for potent surface active compound production of which 427 and 274 were obtained after direct plating and enrichment, respectively. Noteworthy, after enrichment culture, fungal populations ranged between 6×10^1 CFU/ml to 10^{10} CFU/ml of enrichment broth with most samples showing populations between 10^7 and 10^9 CFU/ml (data not shown).

After growing each isolate in BSF5 and Kavadia medium, supernatant surface activity was tested using PMT and OST. One hundred and seventy nine isolates (25.5% of total isolates) were positive to at least one of the screening tests while 105 were positive to the 2 two tests. A chi-square test of independence showed that there was not any significant relationship ($p=0.21$) between the isolation method (i.e., direct plating or enrichment culture) and the number of positive isolates, indicating that enrichment did not increase the odds to isolate surfactant-producing fungi. Furthermore, 126 and 86 isolates were respectively positive after cultivation in BSF5 and Kavadia medium while only 33 isolates showed activity after cultivation in both media. The cultivation medium impact was confirmed by a chi-square test of independence, showing that positive isolates were overrepresented after cultivation in BSF5 medium ($p=0.003$; difference between obtained and predicted values=+20). In addition,

isolates positive to the OST test were slightly overrepresented after cultivation in the BSF5 medium ($p=0.045$; difference between obtained and predicted value=+10). Concerning the distribution of positive isolates between sampling sites and sample types, 32 (24.4% of total isolates), 51 (20.4%), 31 (27.2%) and 65 (31.4%) were isolated from Brest harbor, Cedre, Ile Grande and Penfeld, respectively, while 126 (27.6%) and 53 (21.5%) isolates were derived from sediment and water samples, respectively (Figure 5). There was not any significant association between the number of positive isolates and sites ($p=0.06$), sample types ($p=0.07$) or sites x sample types ($p=0.06$). Concerning the relationship between the number of positive isolates and sampling season, no significant association was found ($p=0.71$).

Following screening of surface active compound production, all 179 positive isolates were identified by sequencing of a gene of taxonomic interest. They were highly diverse and belonged to 3 phyla, 49 genera and 83 fungal species (Table S1). As shown in Figure 6, between 3 and 42 genera from each site x sampling type were identified as surfactant producers, underlining that, within the same sampling site and sample type, diversity of surfactant producers was shared between each site without strong predominance of one particular genus. Nevertheless, overall, major genera among positive isolates were *Fusarium*, *Trichoderma*, *Candida* and *Penicillium* spp. representing 16.8, 11.7, 6, and 5% of total isolates, respectively. At the species level, the latter genera were represented by 4 to 7 species of which *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum* and *Candida pseudolambica*, were the most common surfactant producing species (Table S1). Other common species included *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans*, *Emericellopsis maritima* and *Geotrichum candidum* (Table S1).

3.5. Screening and identification of surface active compound-producing fungi

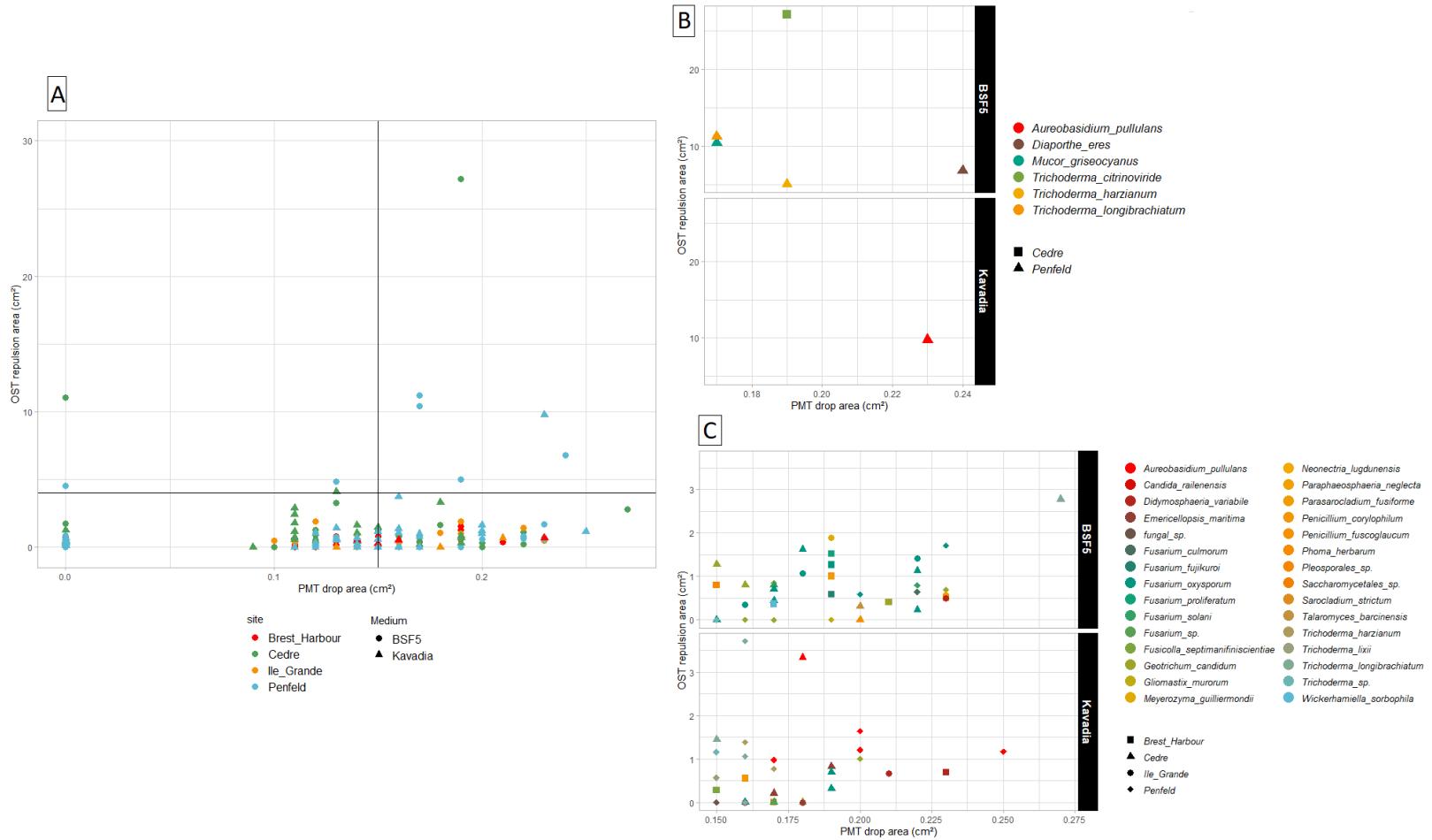


Fig 5. (A) Scatter plot showing parafilm M (PMT) and oil spreading (OST) tests values of the 179 isolates positive to one of the two tests; (B) Taxonomic assignment of fungal isolates showing PMT values $> 0.15 \text{ cm}^2$ and OST values $< 4 \text{ cm}^2$; (C) Taxonomic assignment of fungal isolates showing PMT values $> 0.15 \text{ cm}^2$ and OST values $> 4 \text{ cm}^2$.

As OST and PMT yielded quantitative results, it allowed a comparison between screened isolates. As shown in Figure 5A in which a scatter plot represents OST and PMT values of each isolate, 3 main groups of isolates could be identified based on arbitrary fixed thresholds of 0.2 cm^2 and 4 cm^2 for PMT and OST values, respectively. The first group representing most isolates (61.3%) and corresponding to the lower left quadrant, was formed by isolates with negligible or little OST and low PMT values. The second group in the lower right quadrant contained isolates (34% of positive isolates) with negligible or little OST and high PMT values. In this group (Figure 5B), different species were found with *Trichoderma longibrachiatum*, *A. pullulans*, *Fusarium oxysporum*, and *G. candidum* presenting the highest PMT values ($> 0.2 \text{ cm}^2$). The third group in the upper right quadrant corresponded to isolates (2.8% of positive isolates) with high OST and PMT values (Figure 5C). This group only harbored 6 isolates belonging to *Aureobasidium pullulans*, *Mucor griseocyanus*, *Trichoderma citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *Diaporthe eres*. Among the latter isolates, one *T. citrinoviride* isolate presented very promising surfactant activity with a repulsion area of 27 cm^2 and a drop area of 0.18 cm^2 , if we compare these values with those of 10% SDS which yielded a repulsion area of 54 cm^2 and a drop area of 0.19 cm^2 . Noteworthy, 1 isolate belonging to *Y. deformans* showed PMT values above 10 cm^2 but null values for OST.

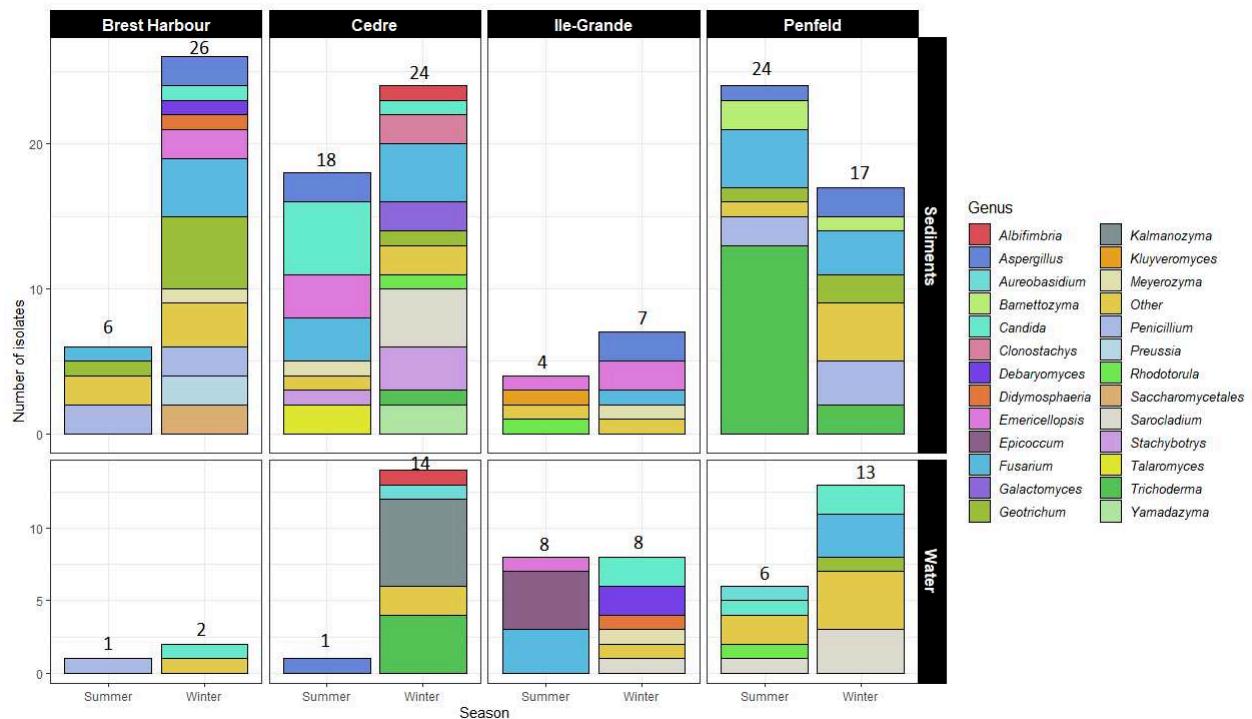


Fig 6. Distribution at the genus level of fungal isolates positive to oil spreading and/or parafilm M tests according to sampling site, sample type and sampling season (Other : genera with only one representative isolate)

4. Discussion

In the first part of the present study, water and sediment samples from 4 oil-polluted sites in Brittany were analyzed in winter and summer for their hydrocarbon content, fungal populations and diversity. All sites were contaminated with hydrocarbons, including *n*-alkanes and PAH, but with different concentrations from one site to another, confirming that these sites were chronically polluted. The highest levels of alkanes and PAHs were found in the Cedre site, which is a pollution control training center where crude oil is frequently spilled in a controlled manner and in an enclosed area, thus the presence of such high hydrocarbon levels were expected.

From an ecological point of view, cultivable fungal populations in sediment and water samples were in the same range as those previously reported in other studies focusing on oil-contaminated sites (Borowik *et al.*, 2017; Bovio *et al.*, 2017; Cipola *et al.*, 2012). These fungal communities were highly diverse and the main identified factor shaping their structure was the sampling site showing quite similar fungal communities in Cedre, Ile-Grande and Brest harbor while those of Penfeld site were slightly different. This result is not surprising as Penfeld site is situated in an estuary river in contrast to other sites which are sea environments. As an example, Penfeld site harbored high relative abundances of *Vibrissaea* sp. which are common lignicolous freshwater fungi inhabiting submerged woody material (Dhanasekaran *et al.*, 2006) but also of *Dimorphosphera* sp. which is also a freshwater Hyphomycete known to decompose leaf litter (Mariz *et al.*, 2021) and of *Neonectria* sp. which is generally found on bark of recently killed woody plants (Chaverri *et al.*, 2011).

On the other hand, the present study also highlighted the main dominant fungal taxa present in oil-contaminated environments which included members of the *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Phoma*, *Aspergillus* and *Trichoderma* as well as *Ochroconis*, *Fusicolla* and *Aureobasidium* genera in specific sites. These results are in agreement with previous studies. In a recent study on oil-contaminated sites following the *Deepwater Horizon* oil spill in the Gulf of Mexico (Velez *et al.*, 2020), the most represented fungal genera were *Aureobasidium*, *Penicillium* and *Cladosporium*. *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichoderma* genera were also the most dominant taxa in a marine site of Sicily following an oil spill (Bovio *et al.*, 2017) while *Fusicolla* (Gałazka *et al.*, 2020) and *Ochroconis* (Wang *et al.*, 2021) have also been

reported in crude-oil contaminated soils in Poland and China, respectively. In order to understand their adaptation and functional role in these ecosystems as well as to potentially exploit their bioremediation potential, isolated members of these genera including but not limited to *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma* were also shown to be hydrocarbonoclastic fungi (Argumedo Delira *et al.*, 2012; Ramdass & Rampersad, 2021; Simister *et al.*, 2015; Venkatesagowda *et al.*, 2014; Zafra & Cortés-Espinosa, 2015).

In the second part of the present study, an *in vitro* screening for surface active compound production in two media was conducted on a large collection of isolates and OST and DCT values were used as proxies to compare surfactant production. To the best of our knowledge, this is the first time that such an extensive screening is performed on fungal isolates from oil-contaminated sites. Overall, 25.5% of total isolates were positive to at least one of the screening tests, indicating that surface active compound production is widespread in fungi originating from these habitats, thus confirming that oil-contaminated environments are a reservoir for surfactant-producing fungi. This finding is not new as other studies have shown surfactant production in individual fungal isolates (Othman *et al.*, 2022; Qazi *et al.*, 2014) or smaller fungal collection (Maamar *et al.*, 2020; Ramdass & Rampersad, 2021; Yalçın *et al.*, 2018) than that used in the present study. Interestingly, despite this feature was not evaluated in the present study, several identified genera/species producing surface active compounds have also been shown to be hydrocarbonoclastic (Azin *et al.*, 2020; Azin *et al.*, 2018; Preethy & Das, 2010). This is not surprising because, as recently reviewed by Santos *et al.* (2016), biosurfactant production plays two major physiological roles (Santos *et al.*, 2016). The first one is the ability to grow on insoluble-in-water substrates like hydrocarbons through surface tension reduction between phases, thus facilitating substrate uptake and metabolism and the second one being an active role in cell adhesion to hydrocarbons. Noteworthy, biosurfactants can also serve as carbon sources in the case of nutrient depletion. As a result, biosurfactant production allows an improvement of fitness by conferring a competitive advantage for growth and survival in these harsh environments.

Finally, the present study also highlighted several isolates from different species with potentially promising surfactant activities among which several species have been reported to produce different classes of surfactant molecules. Among them, *T. citrinoviride* and *T. harzianum* have been already reported for lipopeptide-like biosurfactant production (Piegza, Pietrzykowska, *et al.*, 2021; Piegza, Szura, *et al.*, 2021) while *T. harzianum* was also reported for cerato-platinin protein production (Pitocchi *et al.*, 2020). To the best of our knowledge,

this is the first time that surfactant production in *A. pullulans*, *M. griseocyanus*, *T. longibrachiatum* and *Diaporthe eres* is reported in the litterature.

5. Conclusion

In conclusion, this study provided new knowledge on the diversity of fungal communities in hydrocarbon contaminated environments and allowed identifying common key genera in these ecosystems. Based on an extensive screening, this study also highlighted that surface active compound production is a common feature within members of these fungal communities, many of which are also known for their ability to degrade hydrocarbons. Several isolates with interesting surfactant activities were identified. Future work could involve a better characterization of their activities (e.g., emulsion, surface-tension reduction, foam formation) and the determination of their chemical nature. Another perspective could be to improve production yield of these compounds among the best candidates through optimization of cultivation parameters (e.g., culture medium composition, cultivation system) and to evaluate their potential for application in the food, cosmetic or depollution context.

Figures supplémentaires

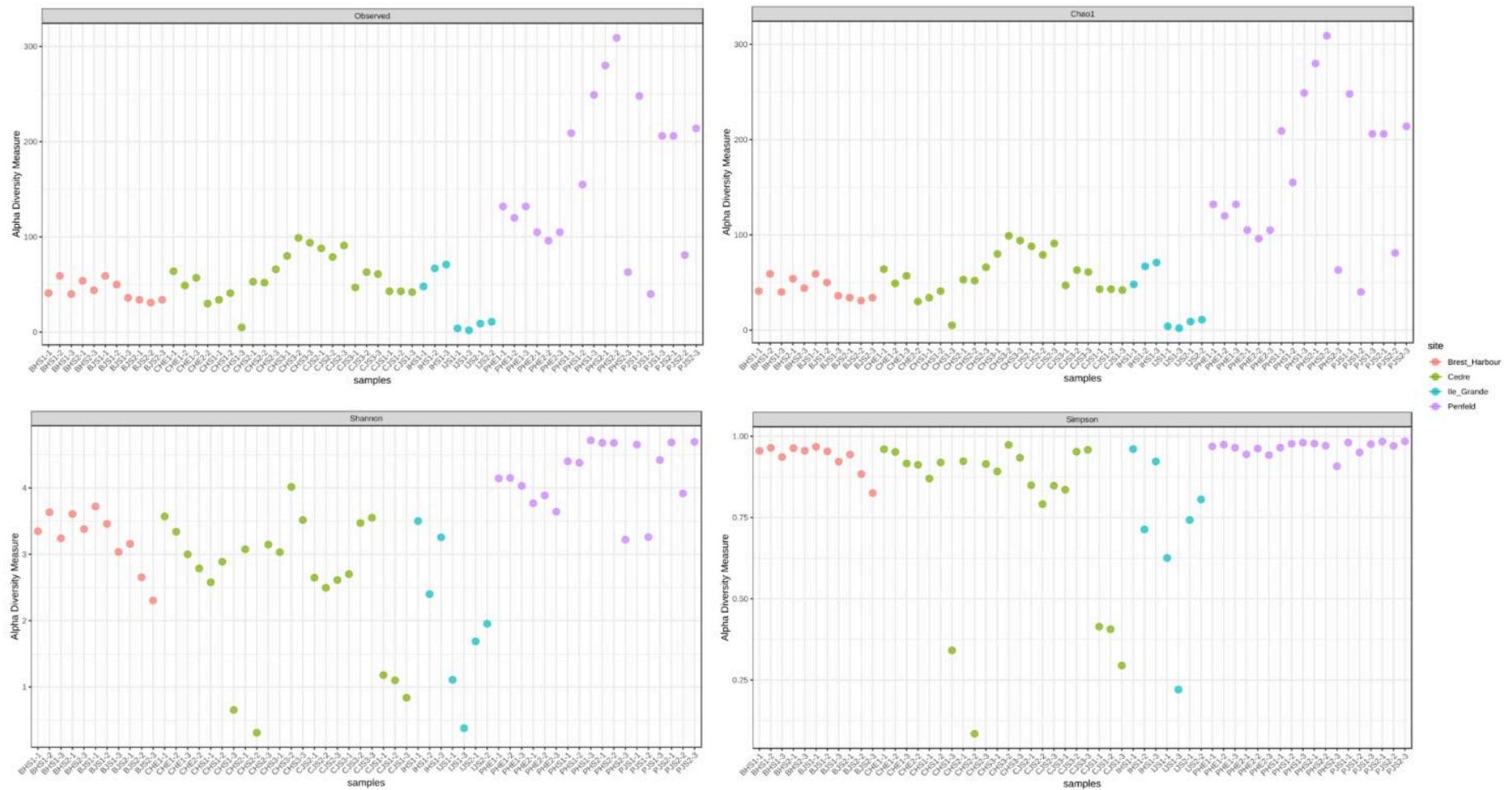


Fig S1. Alpha diversity indices of water and sediment samples collected at the four sampling sites (C : Cedre, P : Penfeld, B : Brest Harbor, I : Ile-Grande ; H : Winter, J : Summer; S : Sediments, E : Water)

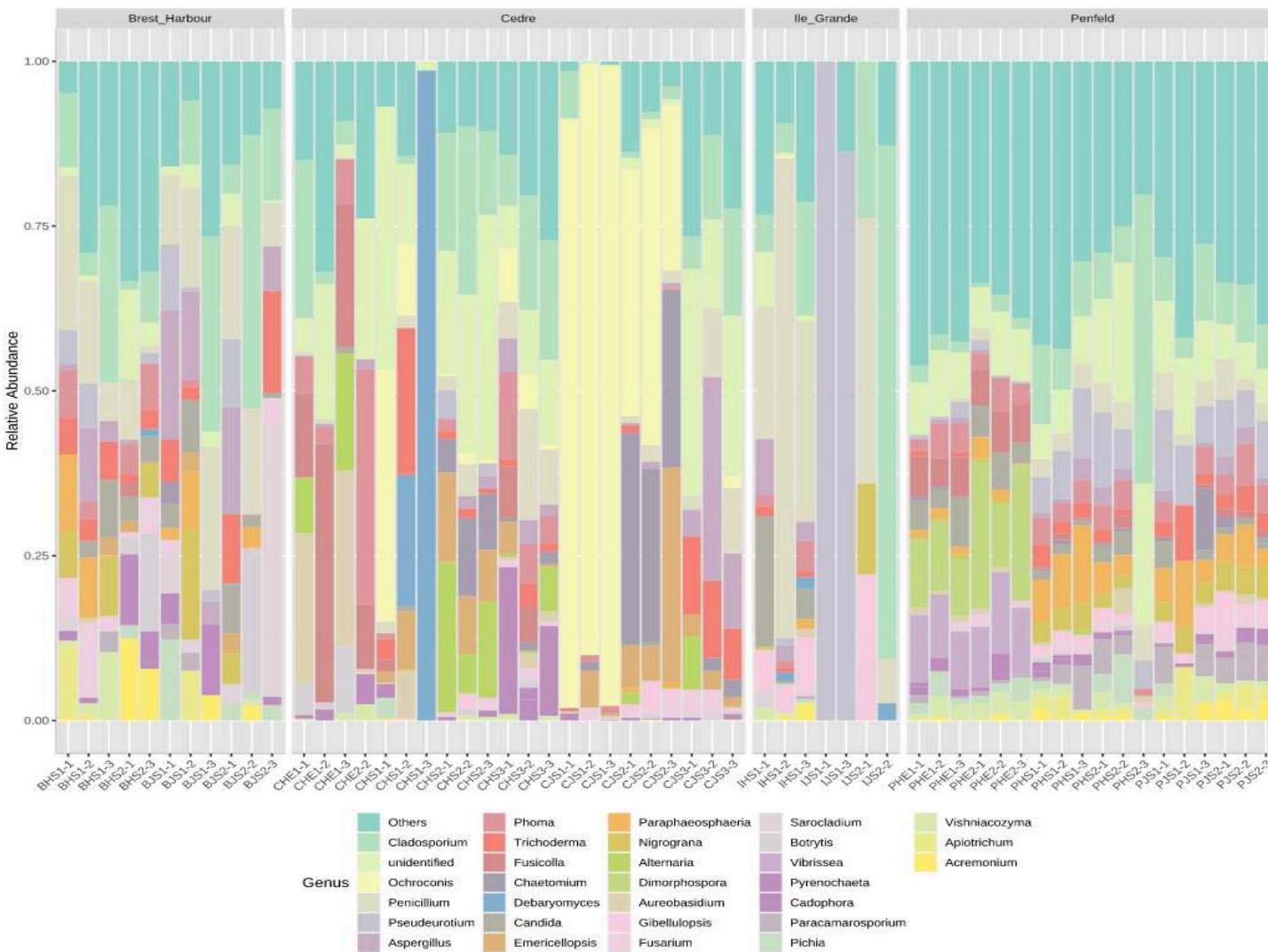


Fig S2. Relative abundances of the top 30 fungal genera according to the 4 sampling sites (C : Cedre, P : Penfeld, B : Brest Harbor, I : Ile-Grande ; H : Winter, J : Summer; S : Sediments, E : Water)

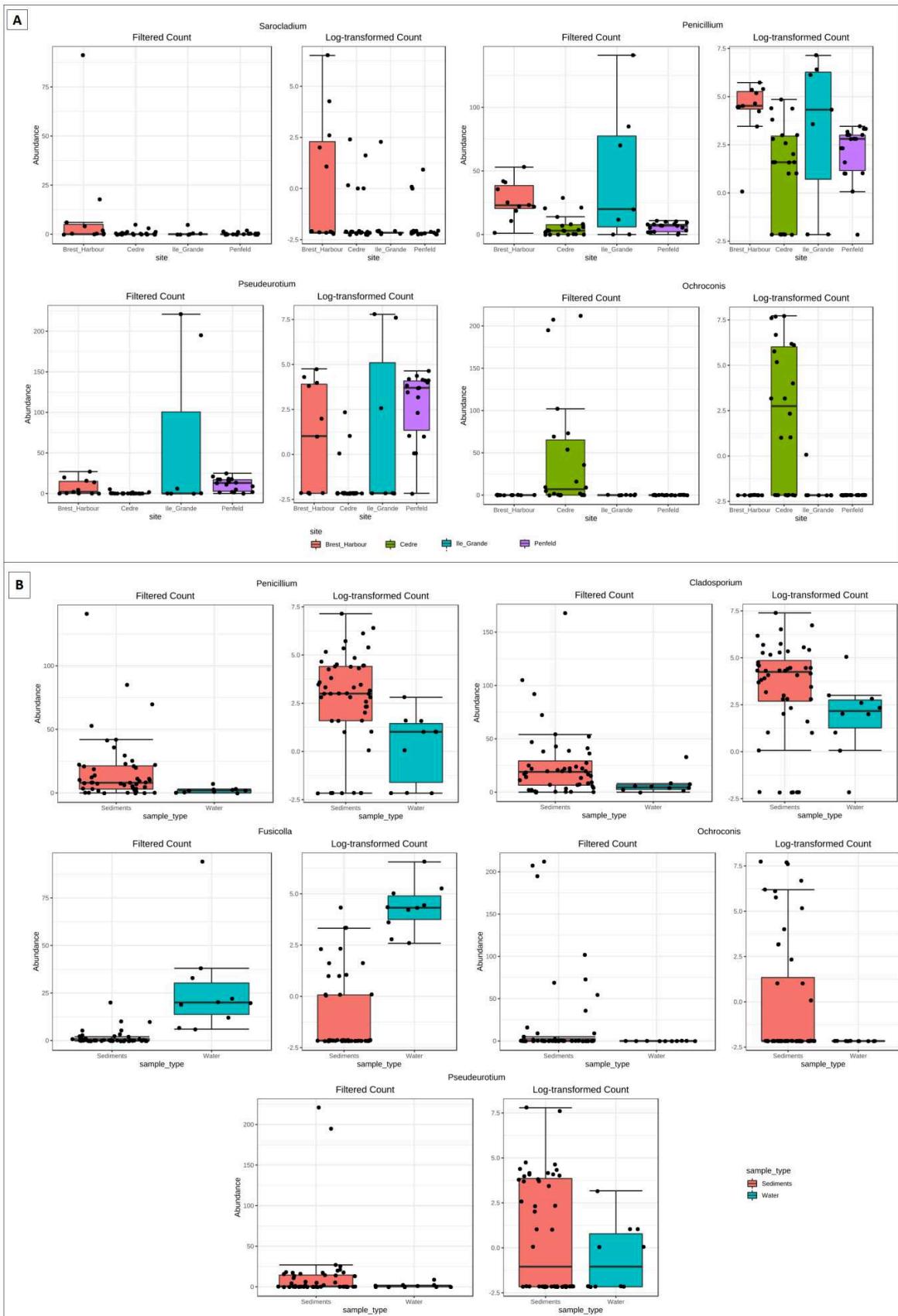


Fig S3. Univariate analysis showing the most abundant (> 5% of relative abundance) fungal genera significantly associated (FDR<0.05) with sampling sites (A) and sample types (B)

Table S1. Identification of isolates positive to parafilm M and/or oil spreading

Taxa	Representatives
<i>Acremonium alternatum</i>	1
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	1
<i>Albifimbria verrucaria</i>	2
<i>Amesia nigricolor</i>	1
<i>Arthrinium kogelbergense</i>	1
<i>Aspergillus udagawae</i>	2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5
<i>Aspergillus protuberus</i>	1
<i>Aspergillus sydowii</i>	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	6
<i>Barnettozyma californica</i>	2
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	1
<i>Candida pseudolambica</i>	3
<i>Candida sake</i>	1
<i>Candida raiilenensis</i>	2
<i>Candida vartiovaarae</i>	1
<i>Candida norvegica</i>	1
<i>Candida</i> sp.	1
<i>Candida boidinii</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i>	1

<i>Cladosporium spinulosum</i>	1
<i>Clonostachys rosea</i>	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2
<i>Diaporthe eres</i>	1
<i>Didymosphaeria variabile</i>	2
<i>Emericellopsis maritima</i>	11
<i>Epicoccum nigrum</i>	1
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	2
<i>fungal</i> sp.	1
<i>Fusarium proliferatum</i>	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	17
<i>Fusarium</i> sp.	2
<i>Fusarium lunatum</i>	1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	1
<i>Fusarium culmorum</i>	1
<i>Fusarium solani</i>	4
<i>Fusarium equiseti</i>	2
<i>Fusicolla septimanifiniscientiae</i>	1
<i>Galactomyces</i> sp.	1
<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	1
<i>Geotrichum candidum</i>	10
<i>Gliomastix murorum</i>	1
<i>Kalmanozyma fusiformata</i>	1

<i>Kluyveromyces nonfermentans</i>	4
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	5
<i>Mucor griseocyanus</i>	1
<i>Neonectria lugdunensis</i>	1
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	1
<i>Parasarocladium fusiforme</i>	1
<i>Penicillium crustosum</i>	1
<i>Penicillium coprophilum</i>	1
<i>Penicillium bialowiezense</i>	1
<i>Penicillium commune</i>	1
<i>Penicillium balearicum</i>	2
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1
<i>Penicillium coryophilum</i>	1
<i>Phaeosphaeria phoenicicola</i>	1
<i>Phoma herbarum</i>	2
<i>Pleosporales</i> sp.	1
<i>Preussia</i> sp.	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2
<i>Rhodotorula</i> sp.	1
<i>Saccharomycetales</i> sp.	2
<i>Sarocladium strictum</i>	7
<i>Scheffersomyces spartinae</i>	3

<i>Stachybotrys chartarum</i>	3
<i>Stachybotrys chlorohalonata</i>	1
<i>Stilbella fimetaria</i>	1
<i>Striaticonidium cinctum</i>	1
<i>Talaromyces barcinensis</i>	1
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	1
<i>Trichoderma atroviride</i>	3
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	2
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	3
<i>Trichoderma</i> sp.	7
<i>Trichoderma harzianum</i>	4
<i>Trichoderma lixii</i>	1
<i>Trichoderma pleuroticola</i>	1
<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	2
<i>Yamadazyma olivae</i>	1
<i>Yamadazyma kitorensis</i>	1
<i>Yarrowia deformans</i>	1

References

- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Argumedo Delira, R., Alarcon, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J., & Peña Cabriales, J. (2012). Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *Journal of environmental management*, 95 Suppl, S291-299. doi:10.1016/j.jenvman.2010.08.011
- Azin, E., Jenab, K., & Moghimi, H. (2020). Biodegradation of crude oil by a halotolerant and biosurfactant producing strain of *Mucor circinelloides* in different microcosm conditions. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-10. doi:10.1080/03067319.2020.1828385
- Azin, E., Moghimi, H., & Heidarytabar, R. (2018). Petroleum Degradation, Biosurfactant and Laccase Production by *Fusarium neocosmosporiellum* RH-10: A Microcosm Study. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27(4), 329-342. doi:10.1080/15320383.2018.1473334
- Baldeweg, F., Warncke, P., Fischer, D., & Gressler, M. (2019). Fungal Biosurfactants from *Mortierella alpina*. *Organic Letters*, 21(5), 1444-1448. doi:10.1021/acs.orglett.9b00193
- Bami, M., Raeisi Estabragh, M. A., Ohadi, M., Banat, I., & Dehghanoudeh, G. (2022). Biosurfactants aided bioremediation mechanisms: A mini-review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 1-17. doi:10.1080/15320383.2021.2016603
- Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, L., Smyth, T., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactant production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sanchez-Garcia, M., Ebersberger, I., Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Yann, B., Sanli, K., Eriksson, K., Vik, U., & Nilsson, R. H. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 914-919. doi:10.1111/2041-210X.12073
- Bhardwaj, G., Cameotra, S., & Chopra, H. (2013). Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. doi:10.4172/2157-7463.1000160
- Bordas, F., & Lafrance, P. (2001). Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contaminé par le pyrène. *Etude et Gestion des Sols*, 8(3), 181-188.
- Borowik, A., Wyszkowska, J., & Oszust, K. (2017). Functional Diversity of Fungal Communities in Soil Contaminated with Diesel Oil. *Frontiers in microbiology*, 8. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01862>
- Bovio, E., Gnavi, G., Prigione, V., Spina, F., Denaro, R., Yakimov, M., Calogero, R., Crisafi, F., & Varese, G. C. (2017). The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site

- after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Sci Total Environ*, 576, 310-318. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.064
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556. doi:10.1080/00275514.1999.12061051
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., & Samuels, G. J. (2011). Delimitation of Neonectria and Cylindrocarpon (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with Cylindrocarpon-like anamorphs. *Studies in Mycology*, 68, 57-78. doi:<https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc*, 15(3), 799-821. doi:10.1038/s41596-019-0264-1
- Chotard, M., Mounier, J., Meye, R., Padel, C., Claude, B., Nehmé, R., Da Silva, D., Floch, S. L., & Lucchesi, M.-E. (2022). Biosurfactant-Producing Mucor Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Applied Microbiology*, 2(1), 248-259. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2673-8007/2/1/18>
- Cipola, C., Cavalcante, A., Dias, A., Rigonato, J., De, M., Fiore, F., Lino, F., Jr, S., Itamar, Melo, S., Aparecida, A., Dirk, J., Fernando, E., Andreote, D., Fasanella, C., Pizzirani-Kleiner, A., Andreote, F., Melo, I., & Elsas, J. (2012). The Selection Exerted by Oil Contamination on Mangrove Fungal Communities. *Water Air and Soil Pollution*, 223, 4233-4243. doi:10.1007/s11270-012-1187-4
- Claus, S., & Van Bogaert, I. N. A. (2017). Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(21), 7811-7821. doi:10.1007/s00253-017-8519-7
- da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., & Robl, D. (2021). Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(10), 2003-2034. doi:10.1007/s00449-021-02597-5
- Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., & Dell'Anno, A. (2018). Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 137, 196-205. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(1), 47-64. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106364>
- Dhanasekaran, V., Jeewon, R., Hyde, K., & Hyde, R. (2006). Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater Ascomycetes. *Fungal Diversity*, 23.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*, 45(W1), W180-w188. doi:10.1093/nar/gkx295
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Forgiarini, A. M., Marquez, R., & Salager, J. L. (2021). Formulation Improvements in the Applications of Surfactant-Oil-Water Systems Using the HLD(N) Approach with Extended Surfactant Structure. *Molecules*, 26(12). doi:10.3390/molecules26123771

- Freitas, B., Brito, J., Brasileiro, P., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2016). Formulation of a Commercial Biosurfactant for Application as a Dispersant of Petroleum and By-products Spilled in Oceans. *Frontiers in microbiology*, 7(1646). doi:10.3389/fmicb.2016.01646
- Gałązka, A., Grządziel, J., Gałązka, R., Gawryjołek, K., Ukalska-Jaruga, A., & Smreczak, B. (2020). Fungal Community, Metabolic Diversity, and Glomalin-Related Soil Proteins (GRSP) Content in Soil Contaminated With Crude Oil After Long-Term Natural Bioremediation. *Frontiers in microbiology*, 11. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.572314>
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330. doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., Petrosino, J. F., Knight, R., & Birren, B. W. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res*, 21(3), 494-504. doi:10.1101/gr.112730.1110
- Hasani zadeh, P., Moghimi, H., & Hamedi, J. (2018). Biosurfactant production by *Mucor circinelloides*: Environmental applications and surface-active properties. *Engineering in Life Sciences*, 18(5), 317-325. doi:<https://doi.org/10.1002/elsc.201700149>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of clinical microbiology*, 35(5), 1216-1223. doi:10.1128/jcm.35.5.1216-1223.1997
- Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-R., & Penttilä, M. (2001). The Hydrophobins HFB1 and HFB2 from *Trichoderma reesei* Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems. *Biomacromolecules*, 2(2), 511-517. doi:10.1021/bm0001493
- Liu, Y., Koh, C., & Ji, L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*, 102, 3927-3933. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.115
- Luft, L., Confortin, T. C., Todero, I., Zabot, G. L., & Mazutti, M. A. (2020). An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1059-1080. doi:10.1080/07388551.2020.1805405
- Maamar, A., Lucchesi, M.-E., Debaets, S., Nguyen van Long, N., Quemener, M., Coton, E., Bouderbala, M., Burgaud, G., & Matallah-Boutiba, A. (2020). Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria). *Diversity*, 12(5). doi:10.3390/d12050196
- Mariz, J., Franco-Duarte, R., Cássio, F., Pascoal, C., & Fernandes, I. (2021). Aquatic Hyphomycete Taxonomic Relatedness Translates into Lower Genetic Divergence of the Nitrate Reductase Gene. *Journal of Fungi*, 7(12). doi:10.3390/jof7121066
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal; Vol 17, No 1: Next Generation Sequencing Data Analysis DO - 10.14806/ej.17.1.200.* Retrieved from <https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>

- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218. doi:[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)
- Moutinho, L. F., Moura, F. R., Silvestre, R. C., & Romão-Dumaresq, A. S. (2021). Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and technoeconomical assessment of rhamnolipid production. *Biotechnology Progress*, 37(2), e3093. doi:<https://doi.org/10.1002/btpr.3093>
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants (Review). *Trends in biotechnology*, 24, 509-515. doi:10.1016/j.tibtech.2006.09.005
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Köljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264. doi:10.1093/nar/gky1022
- Norton, J. M. (2012). *Fungi for Bioremediation of Hydrocarbon Pollutants*.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz Randy, C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049. doi:10.1073/pnas.95.5.2044
- Olesen, S. W., Duvallet, C., & Alm, E. J. (2017). dbOTU3: A new implementation of distribution-based OTU calling. *PloS one*, 12(5), e0176335. doi:10.1371/journal.pone.0176335
- Othman, A. R., Ismail, N. S., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Kurniawan, S. B., Sharuddin, S. S. N., & Ismail, N. I. (2022). Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107621. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107621>
- Piegza, M., Pietrzykowska, J., Trojan-Piegza, J., & Łaba, W. (2021). Biosurfactants from Trichoderma Filamentous Fungi-A Preliminary Study. *Biomolecules*, 11(4), 519. doi:10.3390/biom11040519
- Piegza, M., Szura, K., & Łaba, W. (2021). Trichoderma citrinoviride: Anti-Fungal Biosurfactants Production Characteristics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2021.778701>
- Pitocchi, R., Cicatiello, P., Birolo, L., Piscitelli, A., Bovio, E., Varese, G. C., & Giardina, P. (2020). Cerato-Platanins from Marine Fungi as Effective Protein Biosurfactants and Bioemulsifiers. *International journal of molecular sciences*, 21(8). doi:10.3390/ijms21082913
- Preethy, C., & Das, N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2.
- Qazi, M. A., Kanwal, T., Jadoon, M., Ahmed, S., & Fatima, N. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. *Biotechnology Progress*, 30(5), 1065-1075. doi:<https://doi.org/10.1002/btpr.1933>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.

- Ramdass, A. C., & Rampersad, S. N. (2021). Biodiversity and biocatalyst activity of culturable hydrocarbonoclastic fungi isolated from Marac–Moruga mud volcano in South Trinidad. *Scientific Reports*, 11(1), 19466. doi:10.1038/s41598-021-98979-6
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. doi:10.3390/ijms17030401
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Simister, R. L., Poutasse, C. M., Thurston, A. M., Reeve, J. L., Baker, M. C., & White, H. K. (2015). Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. *Marine pollution bulletin*, 100(1), 327-333. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.029>
- Singh, A., Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv*, 25(1), 99-121. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.10.004
- Singh, P., Jain, R., Srivastava, N., Borthakur, A., Pal, D. B., Singh, R., Madhav, S., Srivastava, P., Tiwary, D., & Mishra, P. K. (2017). Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(3), 155-201. doi:10.1080/10643389.2017.1318616
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by Pseudomonas: from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136-146. doi:<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS one*, 7(7), e40863. doi:10.1371/journal.pone.0040863
- UNITE Community. (2019). UNITE general FASTA release for Fungi. Version 18.11. 2018.
- Velez, P., Gasca-Pineda, J., & Riquelme, M. (2020). Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 153, 104816. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104816>
- Venkatesagowda, B., Pugazhendi, A., & Ebenezer, P. (2014). Enzymatic bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India*, 35, 521-529.
- Wan, Z.-L., Wang, L.-Y., Yang, X.-Q., Wang, J.-M., & Wang, L.-J. (2016). Controlled formation and stabilization of nanosized colloidal suspensions by combination of soy protein and biosurfactant stevioside as stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 52, 317-328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.005>
- Wang, J., Jing, M., Zhang, W., Zhang, G., Zhang, B., Liu, G., Chen, T., & Zhao, Z. (2021). Assessment of organic compost and biochar in promoting phytoremediation of crude-oil contaminated soil using Calendula officinalis in the Loess Plateau, China. *Journal of Arid Land*, 13(6), 612-628. doi:10.1007/s40333-021-0011-7
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Yalçın, H. T., Ergin-Tepesbaşı, G., & Uyar, E. (2018). Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *J Basic Microbiol*, 58(9), 782-792. doi:10.1002/jobm.201800126

Zafra, G., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Trichoderma species: a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19426-19433. doi:10.1007/s11356-015-5602-4

CHAPITRE III : Optimisation, montée en échelle et caractérisation chimique préliminaire de bio-tensioactifs produits par *Trichoderma citrinoviride*

I- Résumé des travaux

Lors de la précédente étude, la souche *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088, isolée à partir de sédiments de la plage du Cedre, a présenté une activité très prometteuse vis-à-vis d'une production de bio-tensioactifs. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier son potentiel de production de manière plus approfondie.

Tout d'abord, une optimisation du milieu de culture a été réalisée d'après un plan expérimental multifactoriel incluant 4 sources de carbone (huile de soja, huile de colza, glycérol et saccharose), 2 sources d'azote (extrait de levure, sulfate d'ammonium), 2 salinités différentes (1 et 3%) et 3 concentrations de la source de carbone (20, 40 et 80 g/L). Les cultures ont à nouveau été réalisées en microplaques Duetz de 24 puits, et les surnageants criblés d'après les mêmes tests : OST et PMT.

Pour les milieux dans lesquels *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 a présenté les meilleurs résultats aux tests, une montée en échelle a été réalisée, passant ainsi de 2,5 à 100 mL de milieux en Erlenmeyer. Trois milieux ont été sélectionnés : deux milieux à base de glycérol (glycérol 20 g/L, extrait de levures 5 g/L, salinité de 1% ; et ; glycérol 40 g/L, extrait de levures 5 g/L, salinité de 3%), et un milieu à base de saccharose (saccharose 80 g/L, extrait de levure 5 g/L, salinité de 1%). Les surnageants ont de nouveau été testés par OST et PMT et seul le milieu contenant 20 g/L de glycérol a conservé l'activité qui avait été observée à une échelle de 2,5 mL. L'abaissement de la tension de surface et la capacité émulsifiante (E24) ont été mesurés en utilisant des extraits du surnageant obtenues après précipitation à pH acide et extraction à l'acétate d'éthyle. La tension de surface était minimale (~38 mN /m), en comparaison de l'eau (72 mN/m), pour une concentration de 2 g/L. L'activité émulsifiante était modérée (valeur maximale de 40%) pour une CMC d'environ 45 g/L

En complément, l'efficacité de dispersion du pétrole à une échelle laboratoire a été évaluée avec différents extraits de *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088. Ceux-ci ont montré une activité dispersante négligeable dans les conditions testées.

Les champignons du genre *Trichoderma* étant capables de produire des lipopeptides et des protéines telles que les hydrophobines et cérato-platanines, deux approches ont été utilisées

pour caractériser les molécules surfactantes produites. L'analyse des extraits par CCM a montré l'absence de spots significatifs indiquant la présence de lipides dans les extraits obtenus par précipitation acide. Une analyse par SDS-PAGE des protéines extraites par bullage et concentration sur microcolonnes a révélé la présence de plusieurs protéines avec une taille comprise entre 10 et 20 kDa, qui pourraient correspondre à des hydrophobines. Une analyse des protéines par spectrométrie de masse MADI-TOF est actuellement en cours pour confirmer cette hypothèse.

La phase d'optimisation et la phase de montée en échelle ont fait l'objet du stage de Master 1 de Charlène Boulet.

II- Article en préparation

Chotard M, Meslet-Cladière L, Boulet C, Kervarec N, Gaillard F, Le Grand F, Lucchesi ME, Le Floch S, Mounier J. Biosurfactant production by *Trichoderma citrinoviride* : optimization, chemical characterization, and dispersion potential. – **en préparation**

Biosurfactant production by *Trichoderma citrinoviride* : optimization, chemical characterization, and dispersion potential

Mélanie Chotard^{1,2}, Laurence Meslet-Cladière¹, Charlène Boulet¹, Nelly Kervarec³, Fanny Gaillard⁴, Fabienne Le Grand⁵, Marie-Elisabeth Lucchesi¹, Stéphane Le Floch², Jérôme Mounier^{1*}

¹Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

²Cedre, 715 rue Alain Colas, Brest, France

³Service Général des plateformes, Plateforme de Spectrométrie de Masse, Université de Brest, CS93837, 3 rue des Archives, Brest, 29238 cedex 3 France; & Service Général des plateformes, Plateforme de RMN-RPE (Résonance Magnétique Nucléaire et Résonance Paramagnétique Electronique), Université de Brest, CS93837, 3 rue des Archives, Brest, 29238 cedex 3 France

⁴Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM EA3884, Quimper, France

⁵University of Brest, Laboratory of Marine Sciences- UMR 6539 CNRS / UBO Univ Brest / IRD / Ifremer, LEMAR – IUEM, 29280 Plouzané, France

*corresponding author: phone: +33 290915121, fax: +33 290915101, email: jerome.mounier@univ-brest.fr

Abstract

Trichoderma spp. are able to produce surface-active molecules from different classes which may have an interest in the depollution field to replace existing synthetic surfactants used for oil spill clean-up. In a previous study focusing on biosurfactant production of fungi from oil-contaminated environments, *Trichoderma citrinoviride* UBOCC-A-121088 showed an interesting potential. In this context, using the Duetz microcultivation system, we first optimized culture medium composition in order to maximize supernatant surface activity using a full factorial design and Parafilm M and oil spreading tests as proxies. The scalability of optimized culture conditions was then assessed. Glycerol at 20 g/L and yeast extract at 5 g/L were identified as the most favorable carbon and nitrogen sources while surfactant activity was maintained in 100-ml cultures. Critical micelle concentration and critical emulsion concentration of crude extracts obtained after acidic precipitation were respectively determined to be 2 and 45 g/L, yielding minimum ST and maximum E₂₄ values of 38 mN/m, indicating an interesting surface activity but a limited emulsification ability as compared to other biosurfactants. Nevertheless, oil dispersion performances were shown to be weak after performing the Warren Spring Laboratory test. Finally, chemical analyses are currently undertaken using MALDI-TOF mass spectrometry to characterize surfactant molecules produced by this strain.

Keywords : fungi, biosurfactants, optimization, environment

1. Introduction

The use of dispersants is commonly accepted as one of the response options for oil spill clean-up in the open sea. These dispersants are made up of solvents and surfactants, which are amphiphilic molecules of great interest because of their ability to reduce interfacial surface tension between oil and water, to facilitate the formation of small oil-surfactant droplets in the water column which can then be more easily bio-degraded and to prevent shoreline oil pollution. The dispersants commonly used are of petrochemical origin and despite being economically viable, they are toxic to pelagic, demersal and benthic marine organisms (Grote *et al.*, 2018; Wise & Wise, 2011).

In this context, it is of interest to develop alternatives to these molecules, *i.e.*, “biosurfactants” also called “green surfactants” or “renewable surfactants”. These molecules which are mainly of microbial origin have the advantage of being non-toxic and biodegradable and could replace conventional synthetic surfactants used in dispersants leading to the development of biosurfactant-based-dispersants (BBD). Several BBD have already been shown to be very effective and less harmful to the environment (Cai *et al.*, 2021).

Biosurfactants include a large number of molecules and are distinguished from bioemulsifiers which have a high molecular weight unlike biosurfactants. These molecules include glycolipids (sophorolipids, rhamnolipids, trehalolipids), lipopeptides and phospholipids (Roy, 2017). In addition, proteins produced by different fungi from the Ascomycota and Basidiomycota phyla can display surfactant properties. These molecules of low molecular weight (5-20 kDa), called hydrophobins, are secreted into the fungal cell wall and are classified into class I and class II hydrophobins depending on their solubility, hydropathy index and their structure at the interface (da Silva *et al.*, 2021; Dokouhaki *et al.*, 2021).

Many studies have reported the ability of bacteria to produce biosurfactants such as *Pseudomonas aeruginosa* (rhamnolipids), *Rhodococcus erythropolis* (trehalose lipids), *Bacillus subtilis* (surfactins) or *Acinetobacter* spp. (phospholipids) (Jahan *et al.*, 2020; Roy, 2017). Biosurfactant molecules are also produced by fungi. Among them, the yeast *Starmerella bombicola* (ex *Candida bombicola*) has been widely studied for its production of sophorolipids (Casas & Garcia-Ochoa, 1999; Felse *et al.*, 2007; Solaiman *et al.*, 2004). Other biosurfactant-producing fungi also include, e.g., *Aspergillus flavus*, *Fusarium fujikuroi*, *Ustilago maydis*, or *Penicillium chrysogenum* which were shown to produce biosurfactant from different families including methoxy-phenyl-oxime glycosides, trehalolipids, glycolipids

and lipopeptides, respectively (Gunjan *et al.*, 2014; Ishaq *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2018).

In recent years, members of the *Trichoderma* genus have also been reported for their ability to produce surface-active compounds belonging to different families including proteinaceous compounds and lipopeptides. Indeed, concerning proteins with surfactant activity, several *Trichoderma* spp. were shown to produce class I and II hydrophobins as well as cerato-platanins (Linder *et al.*, 2001; Pitocchi *et al.*, 2020) while lipopeptide production was recently evidenced in *Trichoderma citrinoviride* (Piegza *et al.*, 2021). Interestingly, members of this genus can also degrade hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons such as phenanthrene (Daccò *et al.*, 2020; Zafra & Cortés-Espinosa, 2015).

Among the different stages allowing biosurfactant product development, a critical step concerns the optimization of cultivation conditions and scalability to maximize biosurfactant yield while maintaining as low as possible production cost, using for example cheap waste carbon sources (e.g., molasses or glycerol) (da Silva *et al.*, 2021; Mouafo *et al.*, 2018). Optimization of biosurfactant production has been extensively studied, notably focusing on factors such as pH, temperature and culture medium composition (da Silva *et al.*, 2021). Concerning the latter, carbon source nature (type of carbohydrate and lipids), nitrogen source and trace elements (e.g., metals) and their associated concentrations are considered as the main factors influencing biosurfactant production yield (da Silva *et al.*, 2021).

In a previous study (Chotard *et al.*, submitted), we assessed surface-active compound production in a large collection of > 700 fungal isolates collected from sediment and water samples in oil-contaminated sites in Brittany (France). Besides showing that surfactant-producing fungi were highly diverse (3 phyla, 49 genera and 83 fungal species) and widespread (25.5% of total isolates) in these oil-contaminated sites, several isolates from different species with potentially promising surfactant activities were evidenced. Among them, *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 isolated from a pollution control training center, showed an interesting potential.

In this context, the aim of the present study was i) to optimize culture medium composition in order to maximize supernatant surface activity of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 using simple and rapid quantitative screening tests, i.e., oil spreading test (OST) and Parafilm M test (PMT) as proxies, ii) to assess the scalability of optimized culture conditions, iii) to further characterize the surfactant activities of surface active molecules produced in optimized conditions, iv) to characterize the chemical nature of produced molecules and v) to assess the dispersant effectiveness of crude extracts using the Warren Spring Laboratory (WSL) test.

2. Materials and methods

2.1. Strain used and spore suspension preparation

T. citrinoviride UBOCC-A-121088 isolated from oil-contaminated sediments in Cedre pollution control training center (Brittany, France) (Chotard *et al.*, submitted) was obtained from the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France). Spore suspension was obtained as described previously (Chotard *et al.*, 2022).

2.2. Optimization of culture medium composition for biosurfactant production and scale-up

2.2.1. Experimental design and cultivation conditions

A full factorial experimental design resulting in 48 experiments (Table 1) was applied to investigate the effects of salinity [2 tested levels : 1 and 3% of sea salts (Sigma, Saint-Louis, USA)], nature and concentration of the carbon source (soybean oil, canola oil, glycerol or sucrose at 20, 40 or 80 g/L) and the nitrogen source [yeast extract (YE) at 5 g/L and ammonium sulfate at 2.15 g/L supplemented with YE at 0.5 g/L (AS+YE)] on two response variables, i.e., supernatant surface activity evaluated using OST and PMT. Each medium was also supplemented with 5 g/L glucose except for saccharose containing media in which glucose was replaced by saccharose (final saccharose concentrations: 25, 45 or 85 g/L). All media were autoclaved at 121°C for 15 min.

For each experiment, cultures were performed in triplicate in 24-square polypropylene deep well plates using the Duetz-MTPS system (Enzysscreen, Heemstede, Netherlands) in Duetz 24-well microplates using 2.5 mL of medium. Fifty µL of *T. citrinoviride* spore solution, standardized to 3.6×10^7 spores/mL, were inoculated in each medium. After mounting deep well plates topped with a sandwich cover on a New Brunswick™ Innova® 44 shaker (Eppendorf, Hamburg, Germany) using a clamp system, plates were incubated at 25°C for 7 days under agitation at 150 rpm. The supernatants were then recovered and centrifuged twice at 9000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants were first filtered on a 1.2-µm glass fiber filter (Grosseron, Couëron, France) and then on a 0.45-µm cellulose acetate filter (Merck Millipore, Burlington, USA). The supernatants were stored at -20°C for further analysis.

Table 1. Factorial experimental design used to assess the effects of different factors on biosurfactant production

Experiment	Carbon source	Factors		
		Carbon source concentration (g/L)	Nitrogen source*	Salinity (%)
1	canola oil	20	YE	1
2	canola oil	40	YE	1
3	canola oil	80	YE	1
4	canola oil	20	YE	3
5	canola oil	40	YE	3
6	canola oil	80	YE	3
7	canola oil	20	YE + AS	1
8	canola oil	40	YE + AS	1
9	canola oil	80	YE + AS	1
10	canola oil	20	YE + AS	3
11	canola oil	40	YE + AS	3
12	canola oil	80	YE + AS	3
13	soybean oil	20	YE	1
14	soybean oil	40	YE	1
15	soybean oil	80	YE	1
16	soybean oil	20	YE	3
17	soybean oil	40	YE	3
18	soybean oil	80	YE	3
19	soybean oil	20	YE + AS	1
21	soybean oil	80	YE + AS	1
20	soybean oil	40	YE + AS	1
22	soybean oil	20	YE + AS	3
23	soybean oil	40	YE + AS	3
24	soybean oil	80	YE + AS	3
25	Glycerol	20	YE	1
26	Glycerol	40	YE	1
27	Glycerol	80	YE	1
28	Glycerol	20	YE	3
29	Glycerol	40	YE	3
30	Glycerol	80	YE	3
31	Glycerol	20	YE + AS	1
32	Glycerol	40	YE + AS	1
33	Glycerol	80	YE + AS	1
34	Glycerol	20	YE + AS	3
35	Glycerol	40	YE + AS	3
36	Glycerol	80	YE + AS	3
37	sucrose	25	YE	1
38	sucrose	45	YE	1
39	sucrose	85	YE	1
40	sucrose	25	YE	3

41	sucrose	45	YE	3
42	sucrose	85	YE	3
43	sucrose	25	YE + AS	1
44	sucrose	45	YE + AS	1
45	sucrose	85	YE + AS	1
46	sucrose	25	YE + AS	3
47	sucrose	45	YE + AS	3
48	sucrose	85	YE + AS	3

*YE, yeast extract at 5 g/L; YE + AS, ammonium sulfate at 2.15 g/L and yeast extract at 0.5 g/L

2.2.2. Scalability of optimized cultivation conditions

To investigate the scalability of optimized culture conditions and the variations in supernatant surface activity during the growth cycle of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088, cultures were conducted in the three best media yielding the highest activities after the previous step in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of selected medium prepared as described above after inoculation with 5 mL of a 3.6×10^7 spores/mL suspension harvested from fresh cultures. All cultures were performed in triplicate and incubated at 25°C for 4, 7 or 14 days under agitation at 175 rpm on an orbital shaker New Brunswick™ Innova® 44 shaker (Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatants were recovered as described above.

2.2.3. Detection of Surface-Active Compounds in Culture Supernatants

2.2.3.1 Oil Spreading Test (OST)

Oil spreading test was performed as described previously (Morikawa *et al.*, 2000) with slight modifications. Briefly, 25 mL of distilled water were placed in a 9-cm-diameter polystyrene Petri dish. Then, 15 µL of crude oil (Rebco, Cedre) were deposited on the water surface in the Petri dish center, and after 2 minutes, 15 µL of cell-free supernatant (CFS) were placed on the oil surface. OST was considered as positive when a halo was observed on the surface, indicating the presence of surface active compounds in the CFS. SDS 20% and distilled water were used as positive and negative control, respectively. Photos were taken and repulsion halo areas were measured by image processing using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012).

2.2.3.2 Parafilm M Test (PMT)

Parafilm M tests were performed as described previously (Yalçın *et al.*, 2018). Fifteen µL were deposited on parafilm (Parafilm M®), previously fixed on graph paper. Then, photos were taken and drop areas were measured by image processing using ImageJ software (Schneider *et al.*, 2012).

2.3 Characterization of surfactant activity of biosurfactant crude extract

2.3.1 Extraction of crude biosurfactant by acidic precipitation

Biosurfactant extraction was performed as described elsewhere (Kiran *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 1991). The medium giving the best results was selected for this step. Supernatants obtained after cultivation in 20 g/L glycerol, 5 g/L glucose, 5 g/L YE and 1% sea salts were acidified to pH 2 with 1 M HCl and stored at 4°C for 24 h. After centrifugation at 8000 x g for 20 min, the precipitate was recovered and then neutralized with 0.067 M phosphate buffer at pH 7. After placing this solution in a separatory funnel, an equal volume of ethyl acetate was added. After gentle stirring and decantation for 1 h, the organic phase was set aside and the process was repeated a second time. The organic phase was recovered and pooled with the first recovered organic phase. Ethyl acetate was then evaporated using a SpeedVac vacuum evaporator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and the resulting extract stored at -20°C until further use. The precipitate extract was weighed and solutions were prepared in distilled water with concentrations ranging from 0.01 g/L to 100 g/L.

2.3.2 Emulsification index (E₂₄)

The E₂₄ index was used to measure the emulsification activity of crude extract solutions. It was performed as described previously (Marques *et al.*, 2020). For this, 1 mL of diesel was placed in test tubes and 1 mL of crude extract solution was added. The tube was then vortexed for 2 minutes at maximum speed and left to stand for 24 h. The emulsion height was then measured as well as the total height. Each test was carried out in triplicate. The E₂₄ index was then calculated according to the following formula:

$$E_{24} = \left(\frac{\text{Height of the emulsion layer}}{\text{Total height}} \right) * 100$$

The E₂₄ values were used to determine critical emulsion concentration (CEC) as described previously (Cai *et al.*, 2021).

2.3.3 Surface tension measurement

The surface tension was determined as described previously (Ahmad *et al.*, 2016), on crude extract solutions. For this, solution density was determined using a density meter (DMA4500M, Anton Paar) and integrated for measuring surface tension using the du Nouy ring type method on a TD2 tensiometer (Lauda, Germany). Calibration on ethanol and pure water was made and control was set on a non-inoculated medium. All measurements were done at room temperature after carefully dipping the platinum ring until equilibrium was reached. The standard deviation was set to 0.01. The surface tension values were used to determine the critical micelle concentration (CMC) as described previously (Cai *et al.*, 2021).

2.4 Preliminary chemical characterization

Preliminary chemical characterization of surface active molecules was performed on one hand on crude extract obtained after acidic precipitation as described above, which were then analyzed by high performance thin-layer chromatography (HPTLC) in order to reveal potential biosurfactant with lipid moieties. On the other hand, biosurfactant characterization was performed on a concentrated extract obtained after air-bubbling which was then analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to reveal proteins followed by NMR and Maldi-ToF spectrometry.

2.4.1. Biosurfactant extraction by air bubbling and concentration

In order to concentrate biosurfactant molecules by air bubbling, the supernatant (~180 mL) was placed in a blender and shaken at maximum speed. The foam was then recovered and stored at 4°C. Part of the foam (2 mL) was then filtered through a Centricon column with a 10-kDa cut-off value (Pierce™, ThermoFisher Scientific, Ville, Pays) after centrifugation at 5000 g for 5 min, and this centrifugation step repeated several times until the 2 mL were passed, resulting in a foam concentrate.

2.4.2. High performance thin layer chromatography on crude extracts obtained after acidic precipitation

Lipids were extracted from ca. 20 mg of dry powder with 6 mL of solvent mixture (CHCl₃:MeOH, 2:1, v:v). Lipid extracts were then flushed with nitrogen gas and sonicated for 15 min to ensure complete lipid extraction.

Lipids classes were separated by High Precision Thin-Layer Chromatography (HPTLC). HPTLC glass plates coated with silica were cleaned and then activated by heating them at 120°C for 30 min. Lipid extracts and a mixture of external standards of known concentrations were spotted (10 μ L) on the plates with an automatic TLC sampler ATS4 (CAMAG). Lipid classes were separated by immersion of the plates in solvent mixtures of different polarities. First the plate was immersed in methyl acetate:isopropanol:CH₃Cl₃:MeOH:KCl 0.25% (10:10:10:4:3.6; v/v), then in hexane:diethyl ether:acetic acid (20:5:0.5; v/v) and finally in hexane:diethyl ether (97:3; v/v), for NL separation. Lipid class revelation was realized by heating the plate 180°C for 30 min after immersion in a solution of CuSO₄ 3% and H₃PO₄ 8% (w/v in distilled water). The plates were read using a scanner densitometer set at 370 nm (TLC Scanner 4, CAMAG). Lipid classes were identified and quantified by comparing retention time and band intensity of each lipid class against those of known external standards using VisionCATS software (v2.5, CAMAG). The external standard was composed of five classes of neutral lipids (NL) and six classes of polar lipids (PL): ALC=Alcohols, FFA=Free fatty acids, FS=Free sterols, SE=Sterol esters, and TAG=Triacylglycerol for NL; LPC=Lysophosphatidyl choline, PC=Phosphatidyl-choline, SPG=Sphingomyelin, PS= Phosphatidyl-serine PI=Phosphatidyl-inositol, CL=Cardiolipin and PE= phosphatidyl-ethanolamine for PL.

2.4.3. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of foam concentrate and trypsin digestion of proteins

SDS-PAGE was performed on foam concentrate. To do so, 12 μ L of foam concentrate were diluted with 5 μ L of a solution containing β -mercaptoethanol (10%), and 15 μ L of this mixture were placed in a well of a gradient gel (4-20%) (Biorad) and migrated using a generator set at 100 V and 40 mA for 1 hour. This was followed by a staining step with a solution containing Coomassie Blue (0.1%), acetic acid (10%) and ethanol (40%) , for 20 minutes followed by 3 consecutive rinsing steps with distilled water.

The gel strips were then cut, washed and destained with HPLC water and acetonitrile. The gel was then placed in the presence of dithiothreitol (DTT) for 15 min at 56°C, the supernatant discarded. The gel was then rinsed with acetonitrile before being placed in the presence of iodoacetamide for 20 min in the dark. The supernatant was then removed and NH₄HCO₃ was added for 10 min and removed. The gel was rinsed again with acetonitrile, the supernatant removed and the gel dried with speedvac for 5 minutes. The gel was then rehydrated with a solution containing 25% NH₄HCO₃, 66% water and 9% trypsin stock solution at 0.1 μ g. μ L⁻¹ (previously resuspended in 1 mM HCl) (Pierce™, Biorad), for 45 minutes on ice. The

supernatant was discarded and 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃ buffer was added and the gel was incubated at 37°C under agitation overnight.

Then, the supernatant was set aside, and the gel was extracted with 1% trifluoroacetic acid for 15 minutes under agitation at 37°C. The supernatant was then recovered and pooled with the previous one. The gel was then extracted with 100% CH₃CN for 15 min at 37°C, under agitation. The supernatant was once again pooled with the previous one. The tube containing the supernatant was dried until complete evaporation and then stored at 4°C until analysis.

2.4.4. Preliminary analyses using NMR and MALDI-TOF spectrometry

Samples were diluted in TA50 (ACN 50%, TFA 50% and water 0.1%). HCCA (alpha cyano 4 hydroxycinnamicacid) was used as matrix (10 mg/mL in 50% (v/v) aqueous solution and acetonitrile acidified with 0.1% TFA). The matrix was mixed with the solution to be analyzed at 1:1 ratio. Then 1 µL of the mixture was deposited on the MTP384 target (BRUKERDaltonics) by pipetting the solution, dried under ambient air. The MALDI TOF spectra were recorded on a BRUKER Autoflex III SmartBeam spectrometer (Bruker, Billerica, USA) equipped with a Laser under nitrogen, at 337 nm, and operating in positive mode. The system was calibrated with the BRUKER BSA tryptic digest of Bovin Albumin. The spectra were recorded between 500 and 4000 Da.

NMR Spectra 1D¹H were recorded at 25°C on a BRUKER Avance 400 spectrometer (Bruker, Billerica, USA) equipped with a 5 mm TBI ¹H/{BB}³¹P inverse probe with Z gradients. Analyses were performed by solubilizing the samples in 700µL of CD₃CN. The spectra were acquired following standard BRUKER pulse programs with 2 seconds delay, 30° pulse and 128 scans, 32 kTD, and a digital resolution of 0.183 Hz. Chemical shifts are given in ppm with TMS as external reference.

2.5 Dispersion efficiency

The Warren Spring Laboratory (WSL) test (Warren Spring Laboratory, 2007) with modifications was used to evaluate the dispersion efficiency of different biosurfactant preparations (foam obtained after air bubbling, concentrated foam, solutions of crude extract obtained after acidic precipitation at 2, 15, and 50 g/L) from *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088.

After placing 250 mL of seawater in a separating funnel, 1 or 2 g of oil (Rebco) and 1 g of biosurfactant preparation or uninoculated medium (negative control) were added. The funnel

was then shaken for 2 min and left to stand for 1 min before recovering 50 mL in a graduated cylinder. Then, an extraction with dichloromethane was carried out in a 100-mL flask. Optical density measurement was performed at 580 nm using a Cary 60 spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) on dichloromethane extract in order to determine the quantity of dispersed oil, according to a previously established calibration curve. Dispersion efficiency was then calculated according to the following formula :

$$E(\%) = \frac{C * V_{flask} * V_i}{m_{oil} * V_r}$$

C : concentration (determined with standard curve)

V_{flask} : volume of dilution (100 mL)

V_i : volume of seawater added in the separating funnel

m_{oil} : mass of oil added

V_r : volume recovered after WSL test

2.6 Statistical analysis

Data from the full factorial design were analyzed using Statgraphics Centurion 18 software (Statgraphics Technologies, Warrenton, VA, USA). A multivariate analysis of variance (MANOVA) was applied to identify factors and two-order interactions between factors that had a significant effect ($p < 0.05$) on the variables of interest (PMT and OST values). Then, for each factor with a significant effect, a multiple mean comparison was performed using the Tukey HSD test. In addition, a factor analysis of mixed data (FAMD) analysis was performed using the FactoMiner package (Lê *et al.*, 2008; Pages & Camiz, 2008) in the Rstudio software. FAMD method is used for data containing both quantitative and qualitative variables and allows to compare them among individuals.

3 Results

3.1. Optimization of culture medium composition for biosurfactant production and scale-up

Figures 1 and 2 show OST and PMT values obtained for each tested medium and the resulting FAMD performed on these data, respectively. Overall, independently of the tested medium, PMT values ranged from 0.096 to 0.224 cm² while OST values ranged from 0 to 36.5 cm² and showed the highest variations (Figure 1). Considering both OST and PMT values according to the tested carbon source, the use of canola and soybean oil did not perform well in terms of supernatant surface activity either in the presence of yeast extract or ammonium sulfate with 1 or 3% sea salts (PMT values ranging from 0.096 to 0.224 cm²; OST values ranging from 0 to

0.880 cm^2). In contrast, the use of glycerol as well as sucrose as a carbon source showed encouraging results for both PMT and OST values in media containing yeast extract supplemented with 1 or 3% sea salts (PMT values ranging from 0.16 to 0.21 cm^2 ; OST values ranging from 0.059 to 36.46 cm^2) but not in media containing ammonium sulfate as a nitrogen source (PMT values ranging from 0.148 to 0.209 cm^2 ; OST values ranging from 0.058 to 8.02 cm^2). Altogether, considering both PMT and OST values, supernatants obtained from culture media containing 20 or 40 g/L glycerol, 5 g/L YE and 1 or 3% sea salts as well as supernatant obtained from medium containing 85 g/L sucrose, 5 g/L YE and 1 sea salts yielded the highest surfactant activities (Figure 1).

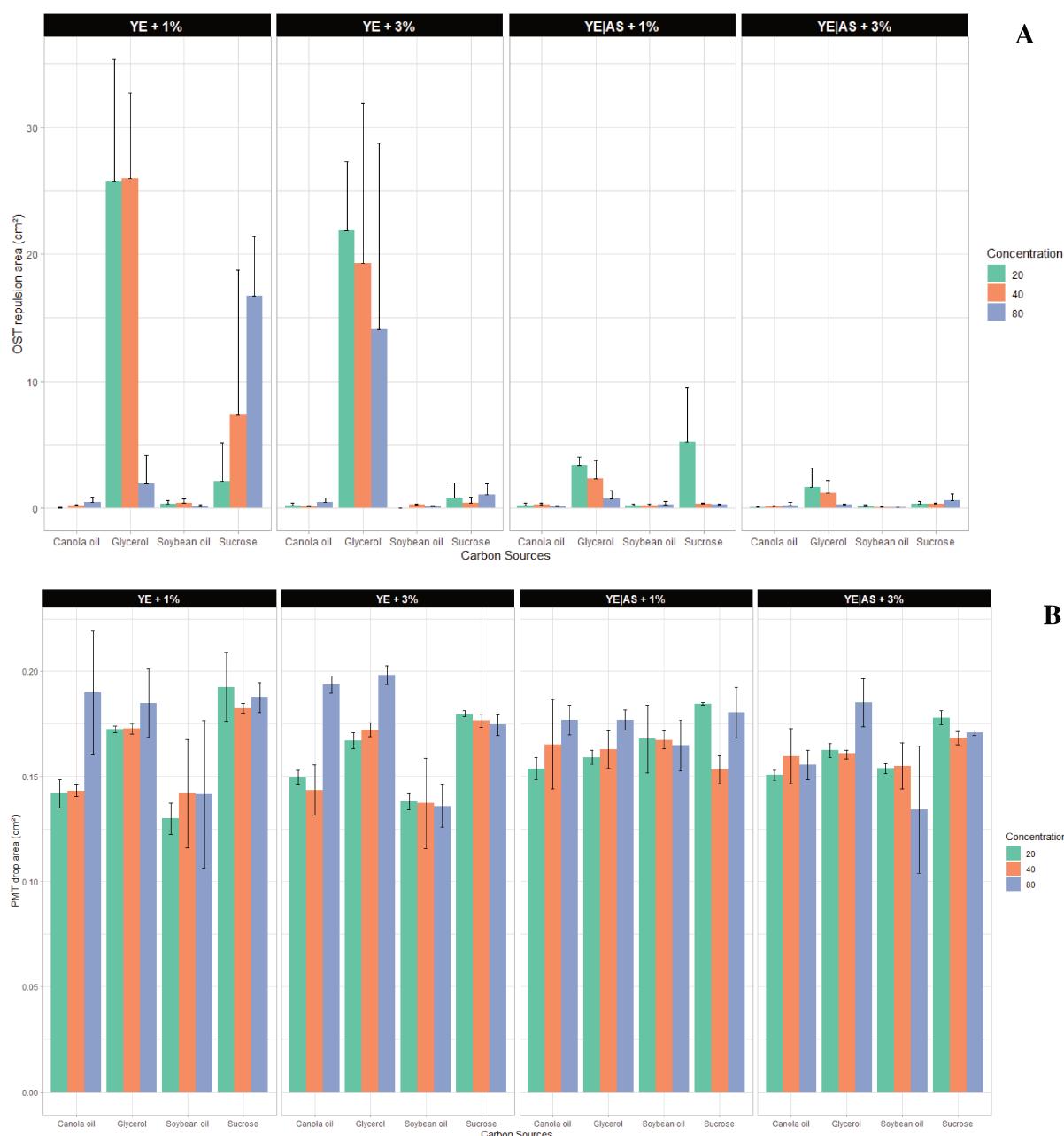


Fig. 1 OST (A) and PMT (B) values of supernatants obtained after cultivation of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 in 48 media with different carbon source nature and concentrations, nitrogen source and sea salts levels (%).

As shown in the PCA using FAMD plots of variables and individuals illustrated in Figure 2, the first and second dimension accounted for 22.6 and 15.6% of the variance. If we only consider factor loadings with values > 0.4 , the variables contributing to the first dimension were OST and PMT while the carbon source variable contributed to both dimensions 1 and 2 (Figure 2A). Individual projection (Figure 2B) clearly separated several supernatants ($\cos^2 > 0.5$) derived from glycerol and sucrose.

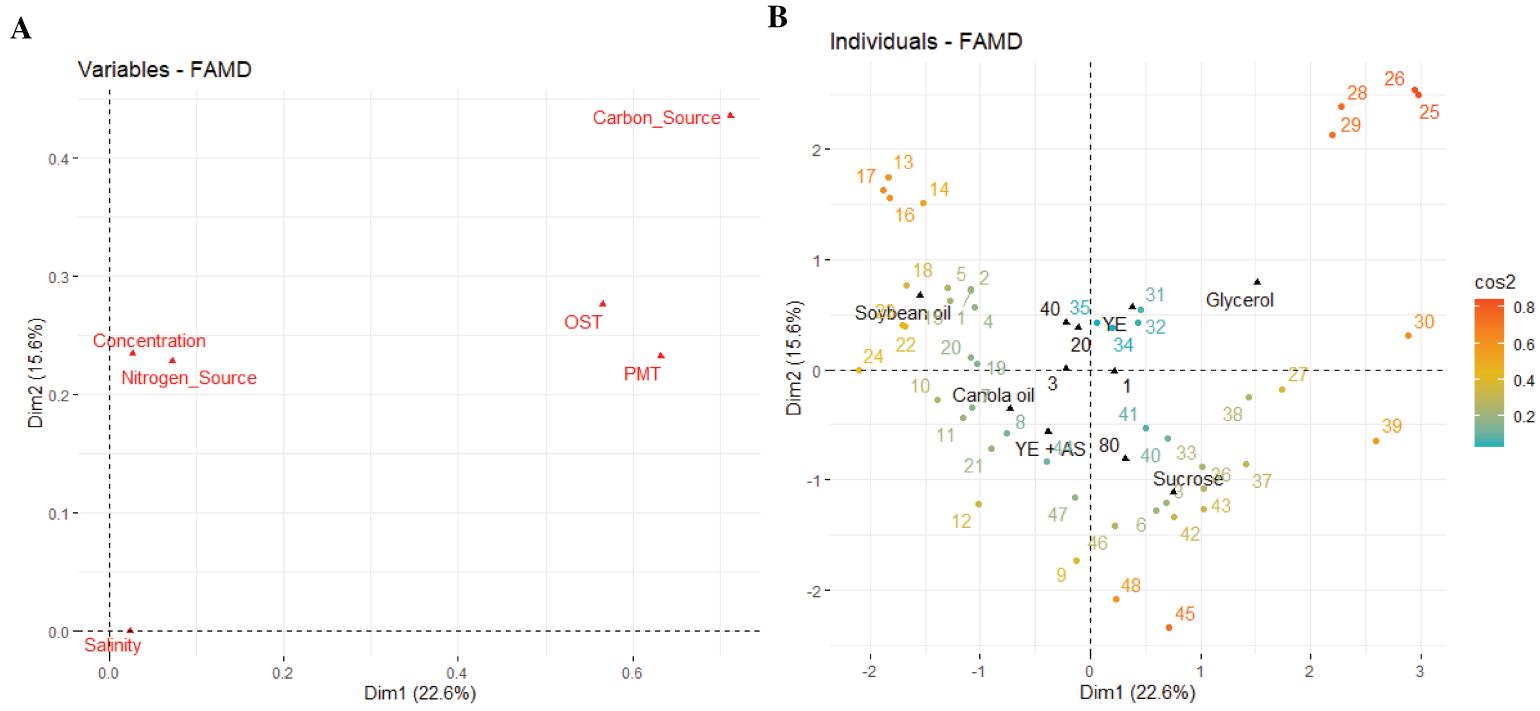


Fig. 2 Principal component analysis using factor analysis of mixed data (FAMD) plots of variables (A) and individuals (B) showing principal component 1 (Dim1, 22.6%) and 2 (Dim2, 15.6%)

The multivariate analysis of variance (MANOVA) confirmed the results presented above (Fig. 1). For PMT results, factors "carbon source" and "concentration" as well as the interactions between factors "carbon source x concentration", "carbon source x nitrogen source" and "concentration x nitrogen source" had a significant effect on PMT values ($p < 0.05$). After comparison of drop area means for each factor with a significant effect, independently of the other studied factors, the drop area means of supernatants obtained after growth with glycerol or sucrose and at high concentrations were significantly higher ($p < 0.05$, Tukey HSD test) than those obtained with the other carbon sources or those with low (20 or 25 g/L) and intermediate (40 or 45 g/L) concentrations. For OST results, factors "carbon source" and "nitrogen source" as well as the interactions between factors "carbon source x concentration" and "carbon source x nitrogen source" had a significant effect on OST values ($p < 0.05$, Tukey HSD test). After comparison of the halo area means for each factor with a significant effect, it was established that, independently of the other studied factors, the halo area means obtained after growth in the presence of glycerol and in the presence of yeast extract were significantly higher ($p < 0.05$, Tukey HSD test) than those obtained with other carbon sources or with ammonium sulfate as a nitrogen source, respectively.

Based on these results, 3 media were selected to investigate the scalability of optimized culture conditions in 100-ml cultures and the variations in supernatant surface activity during the growth cycle of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088, i.e. (i) G20 : 20 g/L glycerol, 5 g/L glucose, 5 g/L YE, 1% sea salts, (ii) G40 : 40 g/L glycerol, 5 g/L YE, 3% sea salts and (iii) S85 : 85 g/L sucrose, 5 g/L YE, 1% sea salts.

3.2. Scalability of optimized culture conditions and variations in supernatant surface activity during growth

In Figure 3 are compared PMT (Figure 3A) and OST (Figure 3B) values obtained in the selected media after cultivation in Duetz 24-well microplates and in Erlenmeyer flasks. Overall, *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 grew well in all tested conditions with dry biomass ranging from 4.21 to 79.71 g/L, the lowest dry biomass being observed in S85 medium after 14 days (4.21 g/L) followed by that obtained in G20 medium after 4, 7 and 14 days (28.89, 22.60 and 16.53 g/L) and the highest in S85 medium after 4 and 7 days followed by those obtained in G40 medium after 4, 7 and 14 days. Independently of the tested medium and incubation time, comparisons of PMT values in 2.5-mL cultures versus 100-mL cultures showed that they were quite similar (Figure 3A). Concerning OST values, these were similar in both conditions for G20 medium at 4, 7 and 14 days and in S85 medium at 14 days.

Noteworthy, for G20 medium, a higher variability in OST values was observed after incubation for 7 and 14 days (coefficient of variation of 64.20 and 38.39%, respectively) than after 4 days (19.29 %). Concerning OST values in G40 medium at 4, 7 and 14 days and S85 medium at 4 and 7 days, they were significantly lower in 100-mL cultures than in 2.5-mL cultures.

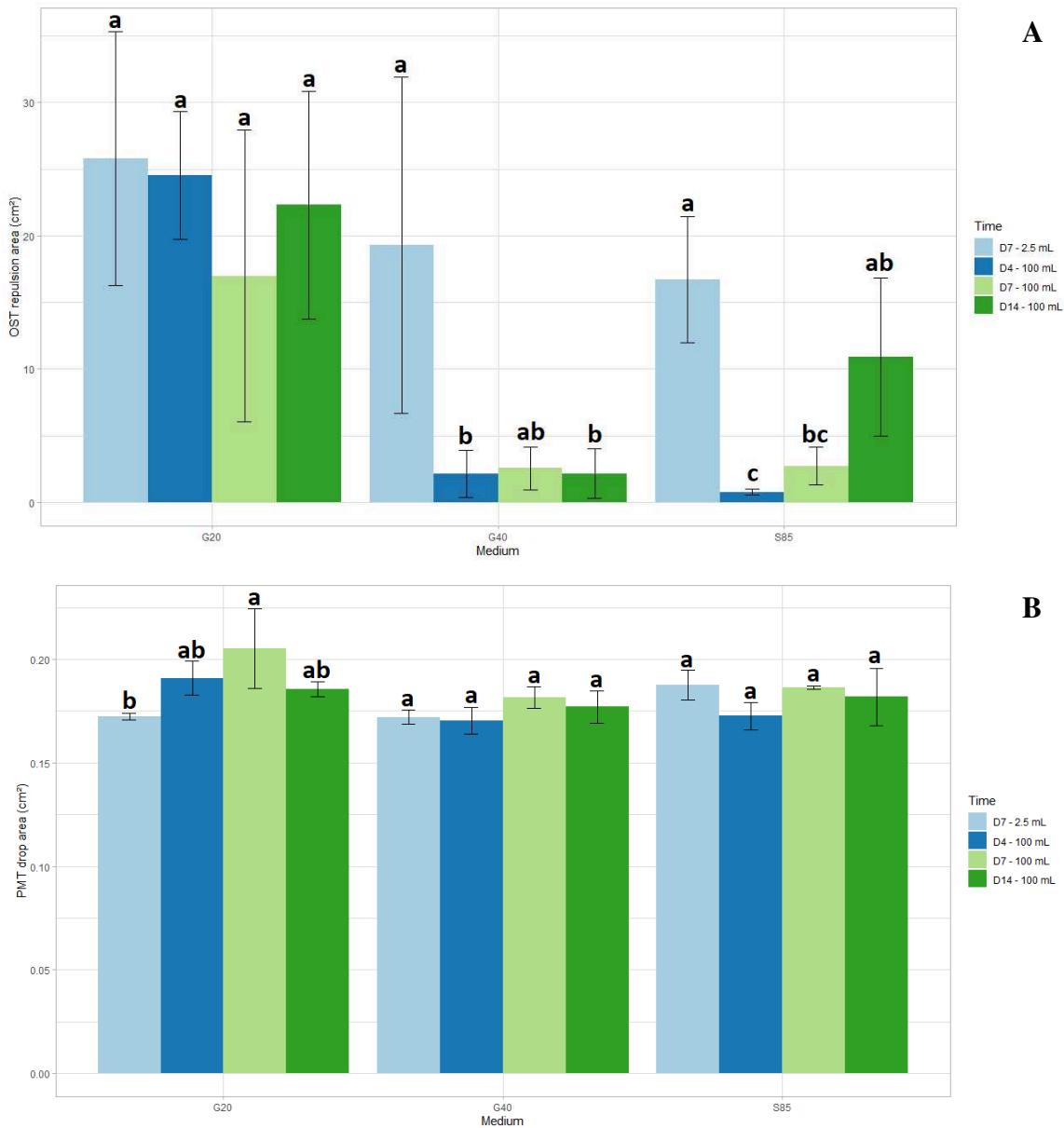


Fig. 3 OST (A) and PMT (B) values of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 supernatants derived from three optimized media and obtained after cultivation in Duetz 24-well microplates using 2.5 mL of medium or in 250-mL Erlenmeyer flasks using 100 mL of medium incubated for 4, 7 and 14 days. G20: 20 g/L glycerol, 5 g/L glucose, 5 g/L YE, 1%

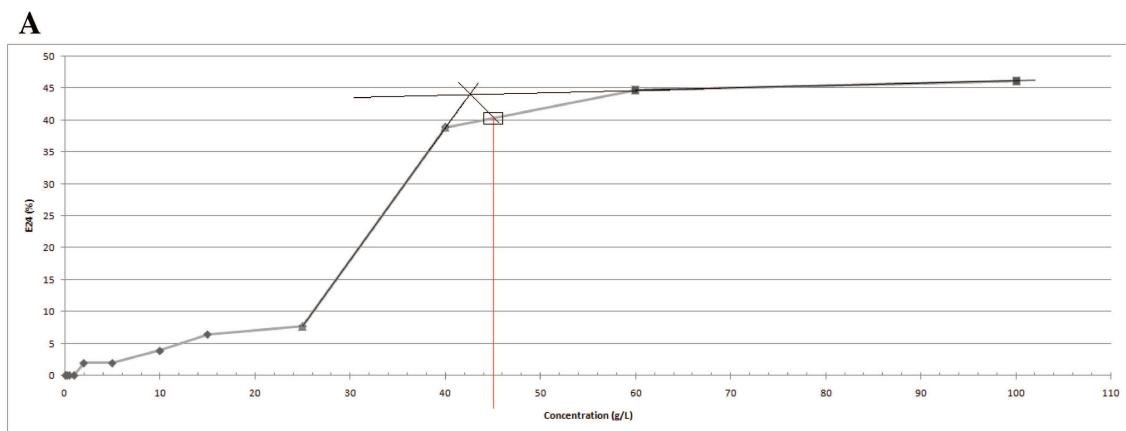
sea salts; G40: 40 g/L glycerol, 5 g/L YE, 3% sea salts; S85: 85 g/L sucrose, 5 g/L YE, 3% sea salts.

3.3. Characterization of surfactant activity of biosurfactant crude extract

3.3.1. Emulsification index (E_{24}) and surface tension (ST) of biosurfactant crude extract

To further characterize the surfactant activity of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088, solutions with varying concentrations (0.01 g/L to 100 g/L) of crude extracts obtained after acidic precipitation of G20 supernatants, were evaluated for their E_{24} and ST to determine the CEC and CMC, respectively (Figure 4). In Figure 4A highlighting the E_{24} of supernatant crude extracts at different concentrations, maximum E_{24} was ~46% for concentrations ranging between 60 and 100 g/L. The CEC which is the transition point to the plateau of the curve resulting from the E_{24} values was estimated from two linear regression curves at 45 g/L for an E_{24} value of 40% (Fig. 4). Noteworthy, SDS 10% which was used as a positive control yielded an E_{24} of $62 \pm 0.5\%$.

As shown in Figure 4B, surface tension was reduced from 65 (water) to 38 mN/m at the plateau. The CMC was estimated to be 2 g/L, indicating a drastic reduction in surface tension at a low concentration. SDS 10% yielded a surface tension of 31.95 ± 0.03 mN/m.



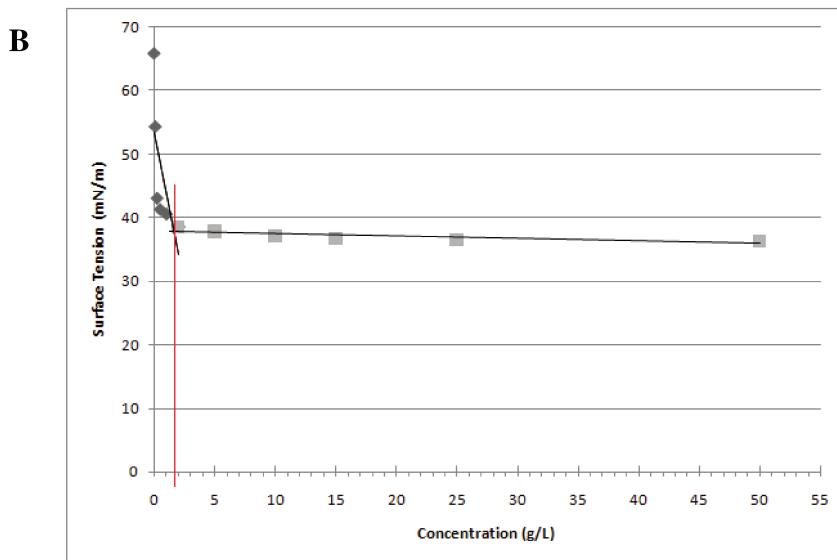


Fig 4. Emulsification index (E_{24}) (A) and surface tension (B) of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 crude extract solutions at different concentrations (CEC and CMC in red)

3.4 Dispersion efficiency

The WSL test was used to determine the dispersion efficiency of different biosurfactant preparations (foam obtained after air bubbling, concentrated foam, solutions of crude extract obtained after acidic precipitation at 2, 15 and 50 g/L) from *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088. In the tested conditions, dispersion efficiencies of biosurfactant preparations were low and ranged from 3.26 to 5.5% (Figure 5). The unconcentrated foam was the only preparation which yielded a low (+2%) but significant increase in dispersion efficiency as compared to the negative control.

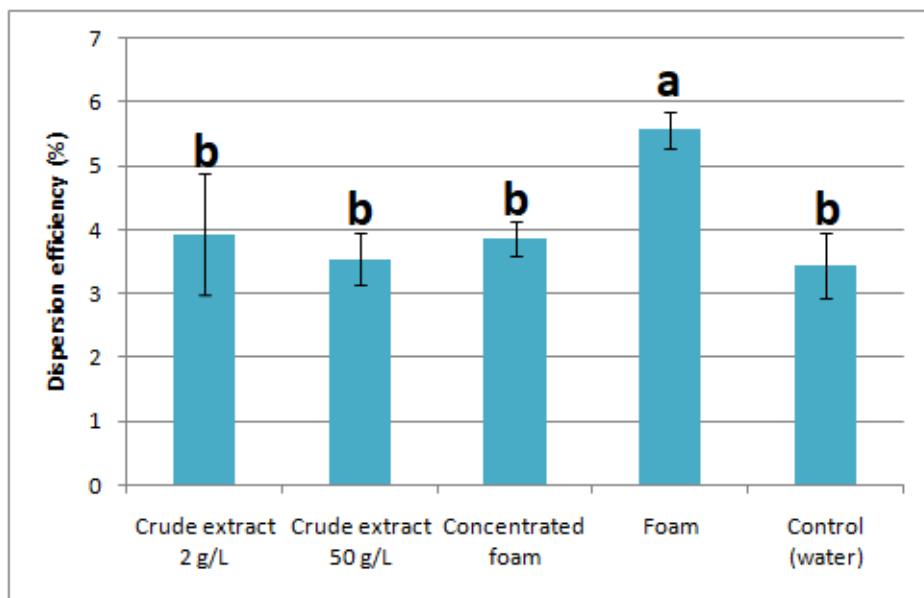


Fig. 5 Dispersion efficiency of different preparations from *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088. Means with different letters are significantly different according to a *Tukey HSD* test.

3.5 Preliminary chemical characterization

First, a crude extract obtained after acidic precipitation was analyzed by HPTLC in order to reveal potential biosurfactants with lipid moieties. No significant spots were revealed indicating the absence of lipid moieties in the tested extracts.

When proteins from the foam concentrate were analyzed by SDS-PAGE, 10 bands of which 4 with a mass between 10 and 15 kDa, 4 with a mass between 25 and 35 kDa and 2 with a mass greater than 35 kDa were revealed (Figure 6). Noteworthy, the surfactant activity of the foam concentrate was confirmed using OST (mean repulsion halo of 54 cm²), confirming the surfactant activity of extracted compounds.

These bands were excised, trypsin-digested and are currently under identification using MALDI-TOF MS analysis.

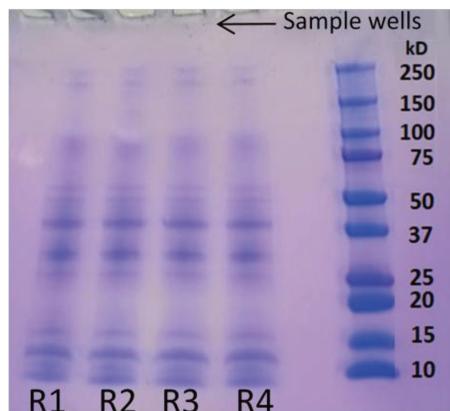


Fig. 6 SDS-PAGE gel showing four replicates (R1, R2, R3 and R4) of foam concentrate proteins (> 10 kDa) of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088

4. Discussion

In the present study, we first evaluated, using a full factorial design, the effects of culture medium composition in order to maximize supernatant surface activity of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088. The combined use of a microtiter plate cultivation technique allowing to perform small-scale fungal cultures under aerobic conditions, and PMT and OST as indirect phenotypic evaluation methods of surface-active compound production were found to be quite useful to quickly assess the effects of a large number of factors without any prior knowledge of the produced surfactant molecules. This is not the first time that the Duetz microcultivation system is applied for high-throughput cultivation of fungi and the screening of their biotechnological properties. As an example, such an approach was used for screening of oleaginous fungi (Kosa *et al.*, 2018) and for evaluating the effects of different factors on lipid and polyphosphate accumulation in Mucromycota fungi (Dzurendova *et al.*, 2021). Concerning the screening tests used, it could have been interesting to measure the E24 index as the culture volume (2.5 mL) is sufficient to conduct such a test. However, it should be underlined that these tests are only indirect phenotypic methods and accurate quantification of surfactant compounds would be preferable to support phenotypic data.

Interestingly, ANOVA showed that the carbon source nature was a significant factor affecting PMT and OST values (glycerol and sucrose being the most favorable) while carbon source concentration and nitrogen source (yeast extract being the most favorable) factors were found to exert significant effects on PMT and OST values, respectively.

This in agreement with previous studies on surfactant production in bacteria and fungi (da Silva *et al.*, 2021). Interestingly, it also appeared that the presence of an hydrophobic inducer

(e.g., vegetable oil) was not required for surface-active molecule production as hydrophilic glycerol and sucrose as the only carbon source yielded the best surface activities. In the case of surfactant with lipid moieties, it is often considered that hydrophobic inducer acts by triggering surfactant production or by providing fatty acid precursors of the surfactant lipophilic moiety (Kim *et al.*, 2010). Further work could involve the investigation of the effects of trace elements (e.g. metals) on surfactant production which are also considered as important factors affecting biosurfactant production (da Silva *et al.*, 2021).

In the present study, the scalability of optimized conditions was then assessed for three selected media. Results showed that, in the tested conditions, scalability was achieved in G20 medium and to some extent in S85 medium after 14 days despite variation coefficients of OST values were high in all media during fungal growth, with the exception of OST values obtained after 4 days in G20 medium. We have no clear explanation for this result but it suggests that other factors than culture medium composition affected surface-active compound production. Such factors include but are not limited to pH, oxygen rate transfer and agitation speed, all of which being able to impact cell physiology and metabolism. Nevertheless, the fact that high surface activity was observed in a glycerol-based medium is interesting as (waste) glycerol can be derived from biodiesel manufacturing (Morita *et al.*, 2007). However, crude waste glycerol contains impurities and toxic compounds (e.g., methanol) which may impair fungal growth. Noteworthy, G20 supernatant of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 showed a lower OST value (30 cm^2) than that reported for *Trichoderma* sp. MK116452 (41.8 cm^2) in a previous study (Matussin *et al.*, Unpublished). However, this comparison should be taken with caution as a different crude oil was applied in the present study.

Then, CMC and CEC of G20 crude extracts obtained after acidic precipitation were respectively determined to be 2 and 45 g/L, yielding minimum ST and maximum E₂₄ values of 38 mN/m and 40%. Despite these values were not obtained using purified compounds, it is of interest to compare them with those of well-known biosurfactants (i.e., surfactins, rhamnolipids, trehalose lipids and exmulsins) as well as that of Corexit 9500A which were recently examined by Cai *et al.* (2021). Overall, the CMC value and minimum surface tension of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 crude extracts were largely lower than that of exmulsins (~500 g/L, 57 mN/m) and in the same range as that of rhamnolipids (1.3 g/L, 40 mN/m). Surfactins, trehalose lipids and Corexit 9500A showed much lower CMC and/or minimum surface tension with values of 0.013 g/L and 29 mN/m, 0.2 g/L and 34.0 mN/m and, 0.032 and 40 mN/m, respectively (Cai *et al.*, 2021). Concerning CEC and maximum E24,

T. citrinoviride UBOCC-A-121088 crude extracts displayed less emulsifying activity than the above mentioned biosurfactants (CEC ranging from 1.56 for surfactins to 19.37 g/L for trehalose lipids; maximum E24 ranging from 60 to 65% for surfactins and exmulsins, respectively) and Corexit 9500A (CEC=1.98 g/L, maximum E24=56%), with the exception of rhamnolipids which did not show any emulsifying activity up to 1016 g/L (Cai *et al.*, 2021). Subsequently, we performed a preliminary chemical characterization of G20 supernatant surfactant molecules. TLC analysis showed that these compounds did not harbor lipid moieties, thereby excluding the presence of glycolipids or lipopeptides in *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 G20 supernatant. Noteworthy, a recent study (Piegza *et al.*, 2021) highlighted a lipopeptide structure in different selected *Trichoderma* spp. including *T. citrinoviride* but the media used for surfactant production in the latter study containing glucose and/or peptone as unique carbon and nitrogen sources significantly differed from that used in the present study.

Based on the results mentioned above, as well as the fact that several *Trichoderma* spp. (*T. reesei*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. aggressivum* var. *europeae* and *T. longibrachiatum*) were shown to produce a specific subclass of class I (Seidl-Seiboth *et al.*, 2011) and/or class II hydrophobins (Kubicek *et al.*, 2008) as well as cerato-platanins (Pitocchi *et al.*, 2020), and the presence of 4 hydrophobin encoding genes in *T. citrinoviride* genomes (data not shown), we searched for proteins in foam protein concentrate using SDS PAGE. SDS PAGE revealed 3 bands of 10, 15 and 20 kDa which could correspond to hydrophobins as their size is comprised between 5 and 20 kDa (da Silva *et al.*, 2021). The identification of excised bands using MALDI-ToF MS is currently underway.

Finally, we evaluated the dispersion efficiency of different *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 extract preparations using the Warren Spring Laboratory (WSL) test. Oil dispersion efficiencies were negligible especially if we compare them with those reported by Cai *et al.* (2021) for surfactins, rhamnolipids and trehalose lipids which were obtained using the baffled-flask test. Several hypotheses can be made to explain these results, the first one being an unbalanced surface activity and emulsion activity. Indeed, as discussed by Cai *et al.* (2021), one of the governing factors affecting the dispersion effectiveness of BBD is their surface activity/emulsification balance index (BI=CMC/CEC) with BBD showing a balanced surface activity and emulsification ability as the best oil dispersion efficacy. This BI can also be normalized for comparative purposes with that of Corexit 9500A ($BI_{relative}=BI_{BBD}/BI_{Corexit\ 9500A}$ with $BI_{Corexit\ 9500A}=0.016$). Calculated BI and $BI_{relative}$ of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 crude extracts were 0.04 and 2.5, respectively while surfactins which showed

interesting oil dispersion efficiency had BI and BI_{relative} values of 0.12 and 0.52 (Cai *et al.*, 2021). Finally, another explanation concerning the poor dispersion effectiveness of tested *T. citrinoviride* preparation could be related to its low oil affinity. Indeed, as the WSL test mimics an oil spill scenario, the sea water volume is important as compared to the oil volume, thus, too high hydrophilic properties will result in surfactant diffusion in the water phase resulting in a loss of activity.

5. Conclusion

This study demonstrated the interesting potential of *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 to produce surfactant molecules with glycerol and yeast extract as the best carbon and nitrogen sources, respectively. The scale- up step from 2.5 mL to 100 mL was overall conclusive for one particular medium, since surfactant activity was maintained despite other yet to be identified factors seemed to impair or cause variations in supernatant surfactant activities. These results should be taken into account to go further in the scale-up process. Surfactant molecules are currently under investigation. Future work could involve a deeper characterization of their structure as well as their physico-chemical (e.g. oil affinity, HLB) and structure-function properties. Despite dispersion efficiency of the tested preparations was found to be negligible, such knowledge would be of interest to possibly improve biosurfactant formulation. This extract could also be combined with other biosurfactants to improve its dispersion efficiency as demonstrated for other biosurfactants by Cai *et al.* (2021). Other applications fields (e.g. food, cosmetic, bioremediation) could also be investigated after evaluating their toxicity and potential biodegradability.

References

- Ahmad, Z., Arshad, M., Asghar, H. N., Sheikh, M. A., & Crowley, D. E. (2016). Isolation, screening and functional characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from crude oil contaminated site. *18*, 542-548. doi:10.17957/IJAB/15.0126
- Cai, Q., Zhu, Z., Chen, B., Lee, K., Nedwed, T. J., Greer, C., & Zhang, B. (2021). A cross-comparison of biosurfactants as marine oil spill dispersants: Governing factors, synergetic effects and fates. *Journal of Hazardous Materials*, *416*, 126122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126122>
- Casas, J. A., & Garcia-Ochoa, F. (1999). Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *J Biosci Bioeng*, *88*(5), 488-494. doi:10.1016/s1389-1723(00)87664-1
- Chotard, M., Mounier, J., Meye, R., Padel, C., Claude, B., Nehmé, R., Da Silva, D., Floch, S. L., & Lucchesi, M.-E. (2022). Biosurfactant-Producing Mucor Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Applied Microbiology*, *2*(1), 248-259. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2673-8007/2/1/18>
- da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., & Robl, D. (2021). Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *44*(10), 2003-2034. doi:10.1007/s00449-021-02597-5
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, M., Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G., & Tosi, S. (2020). Trichoderma: Evaluation of Its Degrading Abilities for the Bioremediation of Hydrocarbon Complex Mixtures. *Applied Sciences*, *10*, 3152. doi:10.3390/app10093152
- Dokouhaki, M., Hung, A., Kasapis, S., & Gras, S. (2021). Hydrophobins and chaperins: Novel bio-surfactants for food dispersions a review. *Trends in Food Science & Technology*, *111*. doi:10.1016/j.tifs.2021.03.001
- Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Reitzel, K., Nielsen, U. G., Dupuy--Galet, B. X., Leivers, S., Horn, S. J., & Shapaval, V. (2021). Calcium Affects Polyphosphate and Lipid Accumulation in Mucoromycota Fungi. *Journal of Fungi*, *7*(4). doi:10.3390/jof7040300
- Felse, P. A., Shah, V., Chan, J., Rao, K. J., & Gross, R. A. (2007). Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(2), 316-323. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmotec.2006.04.013>
- Grote, M., van Bernem, C., Böhme, B., Callies, U., Calvez, I., Christie, B., Colcomb, K., Damian, H.-P., Farke, H., Gräbsch, C., Hunt, A., Höfer, T., Knaack, J., Kraus, U., Le Floch, S., Le Lann, G., Leuchs, H., Nagel, A., Nies, H., Nordhausen, W., Rauterberg, J., Reichenbach, D., Scheiffarth, G., Schwichtenberg, F., Theobald, N., Voß, J., & Wahrendorf, D.-S. (2018). The potential for dispersant use as a maritime oil spill response measure in German waters. *Marine pollution bulletin*, *129*(2), 623-632. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.050>
- Gunjan, G., Vishwas, M., Payal, V., Ajay, K. P., & Sangeeta, N. (2014). A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, *04*(06). doi:10.4172/2155-9821.1000177
- Ishaq, U., Akram, M., Iqbal, Z., Rafiq, M., Akrem, A., Nadeem, M., Shafi, F., Shafiq, Z., Mahmood, S., & Baig, M. (2015). Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, *119*. doi:10.1111/jam.12929

- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol*, 20(1), 138-145.
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Rajeetha Ravji, T., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 250-256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>
- Kosa, G., Zimmermann, B., Kohler, A., Ekeberg, D., Afseth, N. K., Mounier, J., & Shapaval, V. (2018). High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low- and high-value lipids. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 66. doi:10.1186/s13068-018-1070-7
- Kubicek, C. P., Baker, S., Gamauf, C., Kenerley, C. M., & Druzhinina, I. S. (2008). Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 4. doi:10.1186/1471-2148-8-4
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1 - 18. doi:10.18637/jss.v025.i01
- Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-R., & Penttilä, M. (2001). The Hydrophobins HFB1 and HFBII from *Trichoderma reesei* Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems. *Biomacromolecules*, 2(2), 511-517. doi:10.1021/bm0001493
- Liu, Y., Koh, C. M., & Ji, L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresour Technol*, 102(4), 3927-3933. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.115
- Marques, N. S. A. A., Silva, I. G. S. d., Cavalcanti, D. L., Maia, P. C. S. V., Santos, V. P., Andrade, R. F. S., & Campos-Takaki, G. M. (2020). Eco-Friendly Bioemulsifier Production by *Mucor circinelloides* UCP0001 Isolated from Mangrove Sediments Using Renewable Substrates for Environmental Applications. *Biomolecules*, 10(3), 365. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/3/365>
- Matussin, N. B. A., Shivanand, P., & Lim, L. H. (Unpublished). Biosurfactant production by *Trichoderma* sp. MK116452 and its possible application in oil recovery. *Research Square*. doi:10.21203/rs.3.rs-19741/v1
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218. doi:[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2007). Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317 T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 78-81. doi:10.1263/jbb.104.78
- 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, 5034783-5034783. doi:10.1155/2018/5034783
- Pagès, J., & Camiz, S. (2008). Analyse factorielle multiple de données mixtes: application à la comparaison de deux codages. *La revue MODULAD*, 38, 178-183.

- Piegza, M., Pietrzykowska, J., Trojan-Piegza, J., & Łaba, W. (2021). Biosurfactants from Trichoderma Filamentous Fungi-A Preliminary Study. *Biomolecules*, 11(4), 519. doi:10.3390/biom11040519
- Pitocchi, R., Cicatiello, P., Birolo, L., Piscitelli, A., Bovio, E., Varese, G. C., & Giardina, P. (2020). Cerato-Platanins from Marine Fungi as Effective Protein Biosurfactants and Bioemulsifiers. *International journal of molecular sciences*, 21(8). doi:10.3390/ijms21082913
- Reis, C., Morandini, L. M. B., Bevilacqua, C. B., Bublitz, F., Ugalde, G., Mazutti, M. A., & Jacques, R. J. S. (2018). First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 49 Suppl 1(Suppl 1), 185-192. doi:10.1016/j.bjm.2018.04.004
- Roy, A. (2017). A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8. doi:10.4172/2090-4541.1000248
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., & Gunkel, W. (1991). Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. *Z Naturforsch C J Biosci*, 46(3-4), 197-203. doi:10.1515/znc-1991-3-407
- Seidl-Seiboth, V., Gruber, S., Sezman, U., Schwecke, T., Albayrak, A., Neuhof, T., von Döhren, H., Baker, S. E., & Kubicek, C. P. (2011). Novel Hydrophobins from Trichoderma Define a New Hydrophobin Subclass: Protein Properties, Evolution, Regulation and Processing. *Journal of Molecular Evolution*, 72(4), 339-351. doi:10.1007/s00239-011-9438-3
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Nuñez, A., & Foglia, T. A. (2004). Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnology Letters*, 26(15), 1241-1245. doi:10.1023/B:BILE.0000036605.80577.30
- Wise, J., & Wise, J. P., Sr. (2011). A review of the toxicity of chemical dispersants. *Reviews on environmental health*, 26(4), 281-300. doi:10.1515/reveh.2011.035
- Yalçın, H. T., Ergin-Tepesbaşı, G., & Uyar, E. (2018). Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *J Basic Microbiol*, 58(9), 782-792. doi:10.1002/jobm.201800126
- Zafra, G., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Trichoderma species: a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19426-19433. doi:10.1007/s11356-015-5602-4

DISCUSSION GÉNÉRALE

A travers ces études, il a été démontré qu'une grande diversité de champignons sont capables de produire des bio-tensioactifs. Cette production avait été déjà mise en évidence chez plusieurs genres fongiques tels que *Candida*, *Aureobasidium*, *Fusarium* ou encore *Aspergillus* et les travaux conduits dans le cadre de cette thèse viennent renforcer les connaissances scientifiques sur le potentiel des champignons.

Au cours de la thèse, différents axes de recherche ont pu être abordés.

De manière préliminaire, des souches de la collection UBOCC appartenant au phylum des Mucoromycota ont été étudiées afin de déterminer si elles étaient capables de produire des bio-tensioactifs. Ces souches, ont présenté des résultats intéressants. D'une part, sur 24 souches testées, 8 avaient d'abord été sélectionnées, car ayant des résultats positifs aux tests de criblage, en vue d'une optimisation de la production de molécules actives. Puis, après sélection du milieu optimal, les 3 meilleures souches ont été sélectionnées pour caractériser leurs molécules actives. La caractérisation chimique préliminaire par CCM a permis de mettre en avant une présence de glycolipides chez les souches de *M. circinelloides*, *M. plumbeus* et *M. mucedo*. Ces résultats étaient cohérents avec des résultats publiés concernant la production de glycolipides par *Mucor hiemalis* et *Mucor circinelloides* (Zadeh *et al.*, 2017 ; Ferreira *et al.*, 2020).

D'autre part, le second axe d'étude s'est focalisé sur des champignons issus d'environnements contaminés. Le postulat initial étant que les champignons présents dans des milieux contaminés aux hydrocarbures sont plus susceptibles de produire des biotensioactifs pour accéder au carbone contenu dans les hydrocarbures. Près de 700 isolats fongiques ont été prélevés dans quatre sites contaminés aux hydrocarbures. Parmi eux, 179 ont présenté des propriétés d'hydrophobie et/ou de répulsion. D'après les analyses de diversité des isolats présentant des activités, des genres prédominants ont été retrouvés, parmi lesquels *Fusarium*, *Trichoderma*, *Candida* et *Penicillium*. Ce sont des genres qui sont couramment retrouvés dans ces environnements et qui affichent des capacités de dégradation d'hydrocarbures, comme les *n*-alcanes notamment (Prenafeta *et al.*, 2018). Ces mêmes genres ont également été rapportés comme capables de produire des bio-tensioactifs, comme présenté dans le Tableau 7. Ces observations tendraient à valider le fait que leur capacité à dégrader les hydrocarbures pourrait être corrélée à leur capacité à produire des bio-tensioactifs.

Au cours des analyses menées pendant la thèse, la souche de *Trichoderma citrinoviride* UBOCC-A-121088, isolée de la plage du Cedre (site le plus riche en hydrocarbures), a présenté le meilleur potentiel de production de bio-tensioactifs. Les premiers résultats ont été validés à partir du milieu BSF5, contenant de l'huile de colza comme source de carbone. S'en

est suivie une interrogation concernant cette source de carbone. En effet, l'objectif final étant de potentiellement produire les molécules à haute échelle, industrielle, il était d'intérêt de tester des sources de carbone, ayant un coût plus faible et idéalement considérées comme déchets industriels. L'huile de soja a été testée afin de prendre en considération une huile végétale autre que l'huile de colza, qui a l'avantage d'être moins chère que cette dernière. Le saccharose est une source de carbone facilement assimilable, moins chère également que d'autres sources de carbone purifiées comme le glucose. Ces trois sources ont été utilisées comme substrat de croissance pour cultiver la souche de *T. citrinoviride* UBOCC-A-121088 mais aucune ne fut satisfaisante après une montée en échelle à l'échelle laboratoire. Le glycérol a été également testé. Cette quatrième source de carbone présente l'intérêt d'être un co-produit de biocarburant, ce qui en fait un déchet qui peut donc être revalorisé. Cette source de carbone est apparue comme le meilleur substrat pour la production de bio-tensioactifs chez *T. citrinoviride*. La montée en échelle de 2,5 à 100 mL à partir de ce substrat n'a pas impacté les résultats aux tests de criblage. Les surnageants issus du milieu contenant 20 g/L de glycérol ont en effet affiché les meilleurs résultats après les cultures en plaques (2,5 mL) et ont affiché des résultats identiques après culture en Erlenmeyer (100 mL). Néanmoins le glycérol utilisé pour ces expérimentations est un glycérol purifié et il serait d'intérêt de tester (i) du glycérol issu d'industries pour lesquelles il est un coproduit non purifié, et (ii) à plus grande échelle, afin de tendre à une culture en bioréacteurs et se rapprocher des conditions biotechnologiques industrielles.

De plus, des tests de tension de surface et d'émulsification ont permis de déterminer les propriétés des molécules produites par *T. citrinoviride*. Celui-ci est en capacité d'abaisser la tension de surface, et d'émulsifier le diesel dans l'eau, mais relativement faiblement en comparaison de la surfactine par exemple. Ces caractéristiques ont dans un premier temps orienté la discussion sur la nature chimique des composés produits par le champignon. En effet, si les mesures de tension de surface avaient affiché des résultats plus probants, la présence de molécules bio-tensioactives de type glycolipides aurait pu être supposée. En outre, la CCM réalisée sur les fractions actives de *T. citrinoviride* n'a pas montré de présence de lipides, ce qui suggère que les activités observées aux tests de criblage ne sont pas dues à des molécules de type glycolipides ou lipopeptides. La littérature ayant rapporté la présence d'hydrophobines chez le genre *Trichoderma*, nous avons investigué cet aspect. Les résultats observés, c'est-à-dire la capacité à émulsifier et le faible abaissement de la tension de surface coïncidaient avec la potentielle présence de ces protéines chez *T. citrinoviride*. Les analyses

chimiques préliminaires tendent également à valider la présence de ces protéines. Le gel SDS PAGE résultant de la migration d'échantillons de mousse concentrée de *T. citrinoviride* a montré des bandes correspondant aux masses connues d'hydrophobines, c'est-à-dire entre 10 et 20 kDa.

La caractérisation chimique par spectrométrie de masse est actuellement en cours et permettra de valider ou d'invalider, ces premières observations. Par ailleurs, les analyses RMN, également en cours, pourront permettre d'établir si des molécules autres que les protéines sont présentes. En effet, si *T. citrinoviride* produit des hydrophobines, il peut possiblement également produire d'autres molécules bio-tensioactives de type glycoprotéines. Ces analyses chimiques boucleront ces études mais ouvriront d'autres perspectives.

Ainsi, une fois les molécules caractérisées, il s'agira de les purifier et les tester plus finement à partir de nouvelles mesures d'émulsification et de tension de surface. Si les molécules demeurent être efficaces, elles pourront être formulées sous forme de dispersant, dont la toxicité devra être étudiée par des tests d'écotoxicologie, et notamment par la détermination de la LC50 sur des crevettes (*Artemia salina*) et sur la bactérie *Vibrio fischeri* dotée de propriétés bioluminescentes. En outre, la HLB des composés purifiés ainsi que leur CMC devront être déterminées afin d'en améliorer la formulation.

D'un point de vue plus fondamental, il pourrait être envisagé de se pencher sur les voies de biosynthèse de ces molécules. Des analyses transcriptomiques pourraient être conduites en vue de déterminer l'implication de gènes dans la synthèse de ces molécules et donc de pouvoir potentiellement optimiser la production de molécules par modification génétique. De plus, si des hydrophobines sont produites, il pourrait aussi être envisagé de surexprimer les gènes codant pour ces protéines et d'en étudier le rôle physiologique.

Enfin, il pourra être d'intérêt de tester la formulation plurielle de composés tensioactifs fongiques. En effet, les *Mucor* producteurs de glycolipides, pourraient voir leurs composés mélangés aux composés produits par le *Trichoderma*, si tant est que les HLB résultantes soient complémentaires pour composer un bon dispersant. Ils pourraient être mélangés à des bio-tensioactifs possédant de bonnes activités émulsifiantes et les effets synergiques de ce cocktail de molécules pourraient être testés, par test E24, mesure de tension de surface, ou encore par tests d'efficacité de dispersion.

Si la formulation de dispersant s'avère non fructueuse, ces molécules pourraient aussi être utilisées à d'autres desseins tels qu'en industrie alimentaire ou en cosmétique si les tests de toxicité s'annoncent bien négatifs, ou en industrie pharmaceutique ou cosmétique.

A contrario si la formulation de dispersant s'avère efficace à l'échelle laboratoire, il sera indispensable de tester son efficacité *in situ*.

Enfin, au cours de la thèse nous nous sommes focalisés sur la souche de *Trichoderma citrinoviride*, mais parmi les 701 isolats, 179 ont présenté des résultats intéressants. Ces autres isolats pourraient être analysés de façon complémentaire, et notamment pour leur capacité à dégrader des hydrocarbures.

VALORISATION

Publications

Article publié

Chotard M, Mounier J, Meye R, Padel C, Claude B, Nehmé R, Da Silva D, Floch SL, Lucchesi M-E. Biosurfactant-Producing *Mucor* Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Applied Microbiology*. 2022; 2(1):248-259.
<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010018>

Article soumis

Chotard M, Lucchesi ME, Hamouche L, Tréguer S, Lelchat F, Le Floch S, Mounier J. Fungal diversity and surfactant-producing fungi in oil contaminated environments. Soumis à Journal of Applied Microbiology. 2022

Communications orales

Chotard M, Meye R, Padel C, Jezequel R, Lelchat F, Le Floch S, Mounier J, Lucchesi ME. Screening and optimization of biosurfactant production in Mucoromycota fungi for use in oil spill dispersant. Sustainable bio-based Surfactants, Paris, France, 4 – 5 Juillet 2019 – **Poster**

Chotard M, Lucchesi ME, Le Floch S, Mounier J. Exploration of the potential of biosurfactants production by fungi from oil contaminated environments. Journées Scientifiques de l’Ecole Doctorale, Brest, France, 30 Juin – 1er Juillet 2021 – **Poster**

Prix de poster de l'espoir

Chotard M, Hamouche L, Le Floch S, Lelchat F, Lucchesi ME, Mounier J. Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons issus d’environnements contaminés aux hydrocarbures. Congrès de l’Institut Brestois Santé Agro Matière, Brest, France, 8 Juin 2021 – **Communication orale**

1^{er} prix des communications orales

Screening and optimization of biosurfactant production in Mucoromycota fungi for use in oil spill dispersant

Mélanie CHOTARD¹, Raïssa MEYE¹, Carole PADEL¹, Ronan JEZEQUEL², Florian LELCHAT², Stéphane LE FLOC'H², Jérôme MOUNIER¹, Marie-Elisabeth LUCCHESI¹

¹Uiv Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

²Cedre, 715 rue Alain Colas, Brest, France



INTRODUCTION

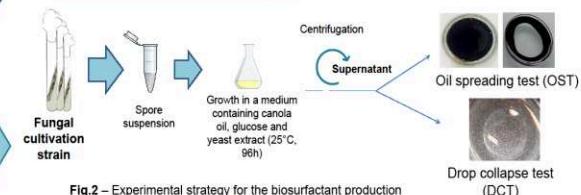
During the last century, the petroleum course has led to oil spills, like the *Amoco Cadiz* in 1978 and *Deepwater Horizon* in 2010. Several methods have been set up to clean up oil spills, like dispersion. Dispersants contain surfactants that create micelles when in contact with oil, thus enhancing oil mobilization in water column and facilitating oil biodegradation. However, currently used synthetic dispersants may be toxic for the marine ecosystem^[1,2]. The aim of this study was to screen a collection of Mucoromycota fungi and optimize medium composition for biosurfactant production to develop less toxic surfactants.

Studied strains

STRAIN NUMBER	SPECIES	ORIGINS	CODE
UBOCC-A-109190	<i>Mucor circinelloides</i>	Insect	MC1
UBOCC-A-109191	<i>Mucor circinelloides</i>	Sediments	MC2
UBOCC-A-109192	<i>Mucor circinelloides</i>	Air	MC3
UBOCC-A-109193	<i>Mucor lanceolatus</i>	Raclette	ML1
UBOCC-A-109194	<i>Mucor fuscus</i>	Unknown	MF1
UBOCC-A-109195	<i>Mucor spinosus</i>	Cheese	MS1
UBOCC-A-109212	<i>Mucor racemosus</i>	Cheese	MR1
UBOCC-A-109213	<i>Mucor racemosus</i>	Cheese rind	MR2
UBOCC-A-109214	<i>Mucor racemosus</i>	Yoghurt	MR3
UBOCC-A-111133	<i>Mucor plumbeus</i>	Fresh dairy products	MP1
UBOCC-A-111125	<i>Mucor plumbeus</i>	Air	MP2
UBOCC-A-111128	<i>Mucor plumbeus</i>	Fresh dairy products	MP3
UBOCC-A-110148	<i>Mucor lanceolatus</i>	Brie cheese rind	ML2
UBOCC-A-101355	<i>Mucor lanceolatus</i>	Unknown	ML3
UBOCC-A-101363	<i>Mucor spinosus</i>	Unknown	MS2
UBOCC-A-101364	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Unknown	MB1
UBOCC-A-102004	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Eggs	MB2
UBOCC-A-109052	<i>Mucor brunneogriseus</i>	Soil	MB3
UBOCC-A-101353	<i>Mucor mucedo</i>	Unknown	MM1
UBOCC-A-101361	<i>Mucor mucedo</i>	Cow feces	MM2
UBOCC-A-101362	<i>Mucor mucedo</i>	Maize	MM3
UBOCC-A-102006	<i>Absidia corymbifera</i>	Eggs	AC
UBOCC-A-101332	<i>Absidia spinosa</i>	Air	AS
UBOCC-A-101331	<i>Absidia ramosa</i>	Cow intestine	AR
UBOCC-A-101330	<i>Absidia glauca</i>	Rumen	AG

Fig.1 –Mucoromycota strains tested for their ability to produce biosurfactant

Strains screening



Strains	MC1	MC2	MC3	ML1	ML2	ML3	MS1	MS2	MM1	MM2	MM3	MR1	MR2	MR3	MP1	MP2	MP3	MB1	MB2	MB3	AC	AS	AR	AG
OST	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
DCT	+	-	-	-	+	+	++	-	+	+	++	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

Fig.3 – Oil spreading and drop collapse tests results on selected strains. The selected strains for further experiments are in bold.

- The drop collapse and oil spreading tests are two complementary tests highlighting repulsive power and hydrophobicity respectively, showing tensioactive potential.
- Among the studied strains, 8 appeared to be promising biosurfactant producers.
- These 8 strains were selected for further experiments.

Culture medium impact

Studied parameter	Medium	Glucose (g/L)	Yeast extract (g/L)	Canola oil (g/L)	Groundnut oil (g/L)	Linseed oil (g/L)
Nitrogen concentration	BSF1	20	5	5	0	0
	BSF2	20	2,5	5	0	0
Canola oil concentration	BSF3	5	5	10	0	0
	BSF4	5	5	15	0	0
Ratio glucose-canola oil	BSF5	5	5	20	0	0
	BSF6	20	5	20	0	0
Oil type	BSF7	5	5	0	15	0
	BSF8	5	5	0	0	15

Fig.4 – Studied parameters and media composition

- 8 culture media were used to evaluate the impact of nitrogen, glucose and oil concentrations on biosurfactant production.
- At the tested concentrations, there was no effect of nitrogen or oil source.
- BSF5 medium was selected as the best biosurfactant production medium for the 8 selected strains.
- Oil spreading and drop collapse tests were carried out once more to measure quantitatively surfactant activity.

Biosurfactant activity in BSF5

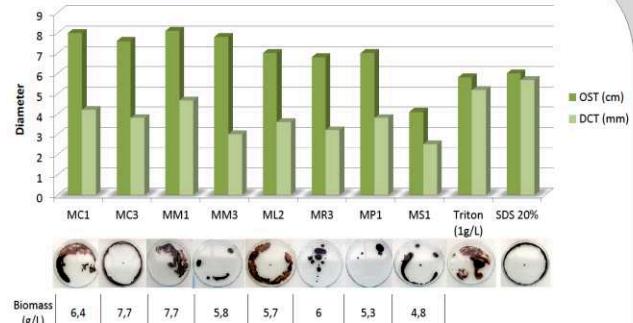


Fig.5 – OST and DCT values, and biomass of the 8 selected strains after cultivation in BSF5 medium. Mean values are based on triplicate measurements. Triton and SDS were used as controls. OST photos for each strain and controls are shown.

- These experiments showed that these strains are efficient biosurfactant producers. OST values of supernatants were higher than controls.
- DCT values of fungal supernatants were lower than those of controls. However MC1, MM1 and MP1 yielded the best values among tested strains.
- The latter strains also yielded high biomass.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

First, 25 strains from Mucoromycota phylum were tested for their potent biosurfactant production. Eight of them, showing promising activity, were selected and their surfactant activity tested in different media. After studying medium composition impact, BSF5 yielded the highest surfactant activity. Finally, 3 strains were selected (MC1, MM3, MP1) to investigate further the nature of the surfactant molecules. The surfactant activity of fungi isolated from contaminated environments is also currently studied.

References

- [1] Rico-Martinez, Roberto & Snell, Terry & Shearer, Tonya. (2012). Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A (R) to the Brachionus plicatilis species complex (Rotifera). Environmental pollution (Barking, Essex : 1987). 173C, 5-10. 10.1016/j.envpol.2012.09.024.
- [2] Wise, J. & Wise, J. (2011). A review of the toxicity of chemical dispersants. Reviews on Environmental Health, 26(4), pp. 281-300. Retrieved 30 Jan. 2019, from doi:10.1515/REVER.2011.035

Acknowledgments

We thank Brest Metropole for their financial support and UBO Culture Collection (Plouzané, France) for providing fungal strains.

Exploration of the potential of biosurfactants production by fungi from oil contaminated environments

Mélanie CHOTARD, Marie-Elisabeth LUCCHESI, Stéphane LE FLOCH, Jérôme MOUNIER

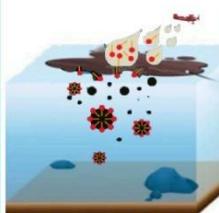


Cedre Brest
DOCTORAT / ECOLOGIE
BRETAGNE / GEOSCIENCES
LOIRE / AGRONOMIE ALIMENTATION



Introduction

Since 1967, many oil accidents have occurred, requiring a cleanup such as dispersion.



1. Dispersants (*Surfactants + Solvents*) spreading
2. Micelles in water column
3. Oil Biodegradation

However dispersant molecules may be toxic.

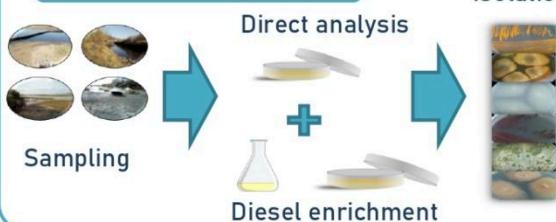
Biosurfactants as an eco-friendly solution

- Produced by microorganisms
- Less toxic, biodegradable
- Various types of molecules : *Glycolipids, Phospholipids, Lipopeptides...*

Fungi are less studied than bacteria, even though they produce interesting metabolites.

Hypothesis : if fungi grow in contaminated areas, they produce biosurfactants and thus may be used in oil clean up

Material & Methods



Isolation



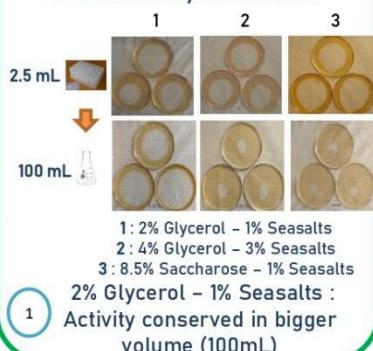
- Optimisation
- *In situ* tests
- Chemical analysis

Molecular Identification

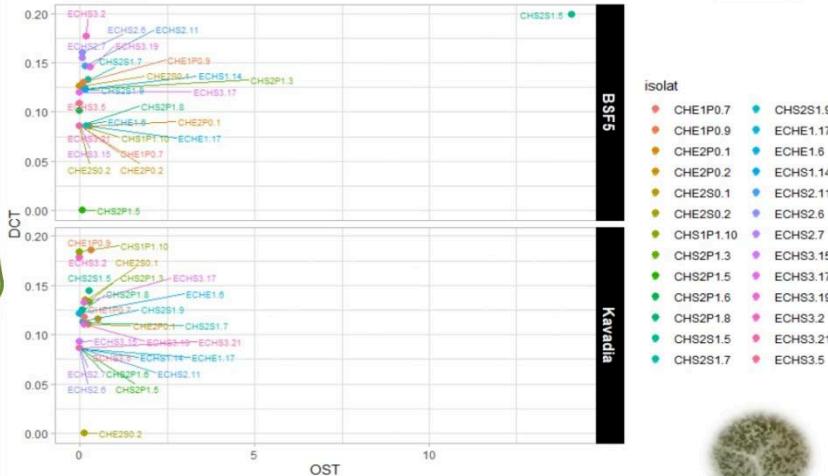
Results

4 Sampling sites
30 Samples
(Water and Sediments)
2 Seasons
(Winter - Summer)
701 fungi isolates

Optimisation and ladder climbing carried out on *Trichoderma citrinoviride*
⇒ 5 studied parameters



Screening : 179 active isolates identified
1 best candidate : *Trichoderma citrinoviride*



Abstract en vue d'une communication au congrès de l'IBSAM

Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons issus d'environnements contaminés aux hydrocarbures

Mélanie Chotard,^a Lydia Hamouche^a, Marie-Elisabeth Lucchesi^a, Stéphane Le Floch^b, Florian Lelchat^b, Jérôme Mounier^a

a- Univ. Brest, LUBEM, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 29280 Plouzané, France

b- Cedre, 715 Rue Alain Colas, 29200 Brest
E-mail : melanie.chotard@univ-brest.fr

Les dispersants ont pour objectif d'épandre le pétrole dans la colonne d'eau sous forme de gouttelettes et donc de faciliter sa biodégradation (Dussauze *et al.*, 2011). Pour l'heure, ces dispersants sont synthétiques et issus de la pétrochimie. Il est donc important de s'interroger sur leur toxicité, et leur capacité à se dégrader dans l'environnement marin. De nombreuses études ont mis en évidence la production de bio-tensioactifs (composants des dispersants) par des micro-organismes et plus particulièrement par des bactéries (Desai & Banat, 1997; Rizzo *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2019). Le potentiel des champignons a été relativement peu exploré, pourtant, ils sont réputés pour leur importante production en métabolites d'intérêt parmi lesquels on retrouve les tensio-actifs (Bhardwaj *et al.*, 2013; Dell'Anno *et al.*, 2018). Cette étude a donc pour objectif de mettre l'accent sur l'exploration de ces molécules chez des champignons. Pour cela, 701 isolats ont été prélevés au cours de quatre échantillonnages réalisés dans des sites contaminés aux hydrocarbures. Ces isolats ont été cultivés dans différents milieux et leurs surnageants criblés à travers deux tests largement utilisés : le Drop Collapse Test et l'Oil Spreading Test. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs et un isolat a été mis en avant pour la poursuite de l'étude.

-
- Dussauze, M., et al., *DISCOBIOL Program: Investigation of Dispersant Use in Coastal and Estuarine*. International Oil Spill Conference Proceedings, 2011. **2011**: p. abs173.
- Desai, J.D. and I.M. Banat, *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 1997. **61**(1): p. 47-64.
- Rizzo, C., et al., *Efficiency in hydrocarbon degradation and biosurfactant production by Joostella sp. A8 when grown in pure culture and consortia*. Journal of Environmental Sciences, 2018. **67**: p. 115-126.
- Xia, M., et al., *Enhanced crude oil depletion by constructed bacterial consortium comprising bioemulsifier producer and petroleum hydrocarbon degraders*. Bioresource Technology, 2019. **282**: p. 456-463.
- Bhardwaj, G., S. Cameotra, and H. Chopra, *Biosurfactants from Fungi: A Review*. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 2013.
- Dell'Anno, F., et al., *Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives*. Marine Environmental Research, 2018. **137**: p. 196-205.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 670-699. doi:10.1007/s12010-015-1603-5
- Abo-State, M. A. M., Osman, M. E., Khattab, O. H., El-Kelani, T. A., & Abdel-Rahman, Z. M. (2021). Degradative pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Phanerochaete chrysosporium* under optimum conditions. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 14(1), 507-520.
doi:<https://doi.org/10.1080/16878507.2021.2001247>
- Adamczak, M., & Bednarski, W. o. (2000). Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 22(4), 313-316. doi:10.1023/A:1005634802997
- Adnan, M., Alshammari, E., Ashraf, S. A., Patel, K., Lad, K., & Patel, M. (2018). Physiological and Molecular Characterization of Biosurfactant Producing Endophytic Fungi *Xylaria regalis* from the Cones of *Thuja plicata* as a Potent Plant Growth Promoter with Its Potential Application. *BioMed research international*, 2018, 1-11. doi:10.1155/2018/7362148
- Ajona, M., & Vasanthi, P. (2021). Bioremediation of petroleum contaminated soils – A review. *Materials Today: Proceedings*, 45, 7117-7122.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.949>
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81-90.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>
- Al-Dossary, M., Abood, S., & Al-Saad, H. (2019). Biodegradation of Crude Oil Using Aspergillus species.
- Al-Hawash, A. B., Alkooranee, J. T., Abbood, H. A., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnology Reports*, 17, 104-109.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.12.006>
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X., & Ma, F. (2019). Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *MicrobiologyOpen*, 8(1), e00619-e00619. doi:10.1002/mbo3.619
- Albakjaji, M. (2010). *La pollution de la mer méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime*. Université Paris-Est, Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00598492> (2010PEST3016)
- Almeida, D. G., Soares da Silva, R. d. C. F., Meira, H. M., Brasileiro, P. P. F., Silva, E. J., Luna, J. M., Rufino, R. D., & Sarubbo, L. A. (2021). Production, Characterization and Commercial Formulation of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP0996 and Its Application in Decontamination of Petroleum Pollutants. *Processes*, 9(5), 885.
- Amenaghawon, A., Osunbor, O., & Obahiagbon, K. (2014). Impact of Nutrients, Aeration and Agitation on the Bioremediation of Crude Oil Polluted Water Using Mixed Microbial Culture. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 2, 43-48. doi:10.12983/ijssres-2014-p0043-0048
- Amodu, O., Ntwampe, S., & Ojumu, T. (2014). Emulsification of Hydrocarbons by Biosurfactant: Exclusive Use of Agrowaste. *Bioresources*, 9, 3508-3526.
doi:10.15376/biores.9.2.3508-3525
- Andrade, C. J. d., Andrade, L. M. d., Rocco, S. A., Sforça, M. L., Pastore, G. M., & Jauregi, P. (2017). A novel approach for the production and purification of mannosylerythritol lipids (MEL) by *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater as substrate.

Separation and Purification Technology, 180, 157-167.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.02.045>

- Andrade, R., Silva, T., Rubio Ribeaux, D., Montero Rodríguez, D., Souza, A., Lima, M., Lima, R., Alves da Silva, A., & Campos Takaki, G. (2018). Promising Biosurfactant Produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using Renewable Resources and Its Application in Cotton Fabric Cleaning Process. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018, 1-12. doi:10.1155/2018/1624573
- April, T. M., Abbott, S. P., Foght, J. M., & Currah, R. S. (1998). Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 44(3), 270-278. doi:10.1139/w97-152
- Arutchelvi, J., & Doble, M. (2010). *Biosurfactants : from genes to applications* (G. Soberon-Chavez Ed. Vol. 20).
- Asgher, M., Arshad, S., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020). Improved biosurfactant production from *Aspergillus niger* through chemical mutagenesis: characterization and RSM optimization. *SN Applied Sciences*, 2(5), 966. doi:10.1007/s42452-020-2783-3
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), 180-209. doi:10.1128/mr.45.1.180-209.1981
- Atlas, R. M. (1988). Biodegradation of hydrocarbons in the environment. *Basic Life Sci*, 45, 211-222. doi:10.1007/978-1-4899-0824-7_14
- Bahé, S. (2008). *Les pollutions maritimes accidentelles en France : risques, planification, gestion de crise*.
- Balan, S. S., Kumar, C. G., & Jayalakshmi, S. (2019). Physicochemical, structural and biological evaluation of Cybersan (trigalactomargarate), a new glycolipid biosurfactant produced by a marine yeast, *Cyberlindnera saturnus* strain SBPN-27. *Process Biochemistry*, 80, 171-180.
- Bami, M., Raeisi Estabragh, M. A., Ohadi, M., Banat, I., & Dehghanoudeh, G. (2022). Biosurfactants aided bioremediation mechanisms: A mini-review. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 1-17. doi:10.1080/15320383.2021.2016603
- Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, L., Smyth, T., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactant production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Banat, I., & Thavasi, R. (2018). *Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications*.
- Barclay, C. D., Farquhar, G. F., & Legge, R. L. (1995). Biodegradation and sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(6), 958-963. doi:10.1007/BF00191197
- Barin, R., Talebi, M., Biria, D., & Beheshti, M. (2014). Fast bioremediation of petroleum-contaminated soils by a consortium of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1701-1710. doi:10.1007/s13762-014-0593-0
- Barnes, N. M., Khodse, V. B., Lotlikar, N. P., Meena, R. M., & Damare, S. R. (2018). Bioremediation potential of hydrocarbon-utilizing fungi from select marine niches of India. *3 Biotech*, 8(1), 21-21. doi:10.1007/s13205-017-1043-8
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B. E. L., Richnow, H. H., Hernández, T., von Bergen, M., & García, C. (2016). The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *J Proteomics*, 135, 162-169. doi:10.1016/j.jprot.2015.07.023

- Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R., & Tótola, M. R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97(6), 868-875.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>
- Baudin, F. (2022). Pétrole : les preuves de son origine biologique. *Encyclopédie de l'Environnement*. Retrieved from <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/preuves-origine-biologique-petrole/>
- Bayry, J., Aimanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latgé, J.-P. (2012). Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLOS Pathogens*, 8(5), e1002700.
doi:10.1371/journal.ppat.1002700
- Ben Ayed, H., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., & Nasri, M. (2014). Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, 49(10), 1699-1707.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Ngando, T. S. (2015). *Environmental microbiology: fundamentals and applications*: Springer.
- Bertrand, J.-C., Doumenq, P., Guyoneaud, R., Marrot, B., Martin-Laurent, F., Matheron, R., Moulin, P., & Soulas, G. (2015). *Applied Microbial Ecology and Bioremediation: Microorganisms as major actors of pollution elimination in the environment*.
- Bertrand, J. C., Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M., & Mille, G. (1994). The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Research in Microbiology*, 145(1), 53-56.
doi:[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90070-1)
- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., & Chopra, H. K. (2015). Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Advances*, 5(67), 54783-54792. doi:10.1039/C5RA08017G
- Bicca, F. C., Fleck, L. C., & Ayub, M. A. Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, 30, 231-236.
- Biteau, J.-J., & Baudin, F. (2017). *Géologie du pétrole: Historique, genèse, exploration, ressources*: Dunod.
- Bonnichsen, L., Bygvraa Svenningsen, N., Rybtke, M., de Bruijn, I., Raaijmakers, J. M., Tolker-Nielsen, T., & Nybroe, O. (2015). Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. *Microbiology*, 161(12), 2289-2297. doi:<https://doi.org/10.1099/mic.0.000191>
- Boonchan, S., Britz Margaret, L., & Stanley Grant, A. (2000). Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1007-1019. doi:10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000
- Boukherissa, M. (2008). *Etude de la stabilité des asphaltènes dans le pétrole brut : choix de dispersants et le mécanisme d'action*.
- Brack, C., Mikolasch, A., Schlueter, R., Otto, A., Becher, D., Wegner, U., Albrecht, D., Riedel, K., & Schauer, F. (2015). Antibacterial Metabolites and Bacteriolytic Enzymes Produced by *Bacillus pumilus* During Bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology*, 17(3), 290-304. doi:10.1007/s10126-015-9614-3
- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I., & Siezen, R. J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 587-594.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x>

- Buskey, E. J., White, H. K., & Esbaugh, A. J. (2016). Impact of Oil Spills on Marine Life in the Gulf of Mexico : effects on plankton, nekton, and deep-sea benthos. *Oceanography*, 29(3), 174-181. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/24862719>
- Camargo-de-Moraes, M. M., Ramos, S. A. F., Pimentel, M. C. B., de Morais Jr, M., & Lima Filho, J. L. (2003). Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 191-194. doi:10.1023/A:1023299111663
- Carolin, F. C., Kumar, P. S., & Ngueagni, P. T. (2021). A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, 407, 124827. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>
- Castiglioni, G. L., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2009). Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Química Nova*, 32, 292-295.
- Cavalero, D. A., & Cooper, D. G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J Biotechnol*, 103(1), 31-41. doi:10.1016/s0168-1656(03)00067-1
- Cedre. (2006). *Mieux comprendre les marées noires*. Brest: Cedre.
- Chandran, P., & Das, N. (2010). *Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species trichosporon asahii isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil*.
- Chang, S.-C., Chen, M.-K., Wei, D.-L., & Cheng, M.-K. (2007). Isolation and characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading enzyme from *Xylaria regalis*. *Fungal Science*, 22(1), 2.
- Chapman, H., Purnell, K., Law, R. J., & Kirby, M. F. (2007). The use of chemical dispersants to combat oil spills at sea: A review of practice and research needs in Europe. *Marine pollution bulletin*, 54(7), 827-838. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.012>
- Chiewpattanakul, P., Phonnok, S., Durand, A., Marie, E., & Thanomsub, B. W. (2010). Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. *J Microbiol Biotechnol*, 20(12), 1664-1671.
- Cho, H.-Y., Tsuchido, T., Ono, H., & Takano, M. (1990). Cell death of *Bacillus subtilis* caused by surfactants at low concentrations results from induced cell autolysis. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(1), 11-14.
- Chotard, M., Mounier, J., Meye, R., Padel, C., Claude, B., Nehmé, R., Da Silva, D., Floch, S. L., & Lucchesi, M.-E. (2022). Biosurfactant-Producing *Mucor* Strains: Selection, Screening, and Chemical Characterization. *Applied Microbiology*, 2(1), 248-259. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2673-8007/2/1/18>
- Coelho, A. L. S., Feuser, P. E., Carciofi, B. A. M., de Andrade, C. J., & de Oliveira, D. (2020). Mannosylerythritol lipids: antimicrobial and biomedical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(6), 2297-2318. doi:10.1007/s00253-020-10354-z
- Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., Giuliano, L., & Denaro, R. (2016). Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Mar Pollut Bull*, 106(1-2), 119-126. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.03.017
- Czinkóczky, R., & Németh, Á. (2020). Techno-economic assessment of *Bacillus* fermentation to produce surfactin and lichenysin. *Biochemical Engineering Journal*, 163, 107719. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107719>
- da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., & Robl, D. (2021). Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential

- applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(10), 2003-2034. doi:10.1007/s00449-021-02597-5
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, M., Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G., & Tosi, S. (2020). Trichoderma: Evaluation of Its Degrading Abilities for the Bioremediation of Hydrocarbon Complex Mixtures. *Applied Sciences*, 10, 3152. doi:10.3390/app10093152
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339-1345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.032>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, 72(9), 1229-1234. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.015
- De Souza, P. M., Andrade Silva, N. R., Souza, D. G., Lima e Silva, T. A., Freitas-Silva, M. C., Andrade, R. F. S., Silva, G. K. B., Albuquerque, C. D. C., Messias, A. S., & Campos-Takaki, G. M. (2018). Production of a Biosurfactant by *Cunninghamella echinulata* Using Renewable Substrates and Its Applications in Enhanced Oil Spill Recovery. *Colloids and Interfaces*, 2(4). doi:10.3390/colloids2040063
- Desai, A. J., & Vyas, P. (2008). *Petroleum and Hydrocarbon Microbiology*.
- Domingos, D. F., de Faria, A. F., de Souza Galaverna, R., Eberlin, M. N., Greenfield, P., Zucchi, T. D., Melo, I. S., Tran-Dinh, N., Midgley, D., & de Oliveira, V. M. (2015). Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 3155-3167. doi:10.1007/s00253-015-6377-8
- Edorh, P. E. (2008). La qualité du transport pétrolier maritime et l'interventionnisme. *Géoéconomie*, 47(4), 113-142. doi:10.3917/geoec.047.0113
- Effendi, A., Kardena, E., & Helmy, Q. (2018). Biosurfactant-Enhanced Petroleum Oil Bioremediation. In (pp. 143-179).
- El-Gendy, N. S., Ali, H. R., El-Nady, M. M., Deriase, S. F., Moustafa, Y. M., & Roushdy, M. I. (2014). Effect of different bioremediation techniques on petroleum biomarkers and asphaltene fraction in oil-polluted sea water. *Desalination and Water Treatment*, 52(40-42), 7484-7494. doi:10.1080/19443994.2013.831784
- El Mahdi, A., Aziz, H., Abu Amr, S., El-Gendy, N., & Nassar, H. (2016). Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. NAF1 and its application in biodegradation of crude oil. *Environmental Earth Sciences*, 75. doi:10.1007/s12665-016-5296-z
- Endo, R. M., Letey, J., Valoras, N., & Osborn, J. F. (1969). Effects of Nonionic Surfactants on Monocots. *Agronomy Journal*, 61(6), 850-854. doi:<https://doi.org/10.2134/agronj1969.00021962006100060007x>
- Estévez, E., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2005). Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 33-37. doi:10.1007/s10295-004-0203-0
- Farrington, J. W. (2014). Oil Pollution in the Marine Environment II: Fates and Effects of Oil Spills. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 56(4), 16-31. doi:10.1080/00139157.2014.922382
- Fei, D., Liu, F.-F., Gang, H.-Z., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Ye, R.-Q., & Mu, B.-Z. (2020). A new member of the surfactin family produced by *Bacillus subtilis* with low toxicity on erythrocyte. *Process Biochemistry*, 94, 164-171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.022>

- Ferreira, I. N. S., Rodríguez, D. M., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. d. S. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 47, 51-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006>
- Fingas, M. (2000). The Basics of Oil Spill Cleanup. doi:10.1201/9781420032598
- Fingas, M. (2016). *Oil spill science and technology*: Gulf professional publishing.
- Foght, J. (2008). Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. *Microbial Physiology*, 15(2-3), 93-120. doi:10.1159/000121324
- Fuller, C., Bonner, J., Page, C., Ernest, A., McDonald, T., & McDonald, S. (2004). Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. *Environ Toxicol Chem*, 23(12), 2941-2949. doi:10.1897/03-548.1
- Garay, L. A., Sitepu, I. R., Cajka, T., Cathcart, E., Fiehn, O., German, J. B., Block, D. E., & Boundy-Mills, K. L. (2017). Simultaneous production of intracellular triacylglycerols and extracellular polyol esters of fatty acids by *Rhodotorula babjevae* and *Rhodotorula aff. paludigena*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(10), 1397-1413. doi:10.1007/s10295-017-1964-6
- Garg, M., Priyanka, & Chatterjee, M. (2018). Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. *Biotechnology Reports*, 18, e00251. doi:<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00251>
- Gaur, V. K., Tripathi, V., & Manickam, N. (2022). Chapter 18 - Bacterial- and fungal-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. In S. Rodriguez-Couto & M. P. Shah (Eds.), *Development in Wastewater Treatment Research and Processes* (pp. 407-427): Elsevier.
- Gentili, A., Cubitto, M., Ferrero, M., & María Susana, R. (2006). Bioremediation of Crude Oil Polluted Seawater by a Hydrocarbon-Degrading Bacterial Strain Immobilized on Chitin and Chitosan Flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57, 222-228. doi:10.1016/j.ibiod.2006.02.009
- Geyer, R., Jambeck Jenna, R., & Law Kara, L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782
- Ghanem, k., Al-Garni, S., & Al-Zahrani, M. (2016). Bioremediation of Diesel Fuel by Fungal Consortium Using Statistical Experimental Designs. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25. doi:10.15244/pjoes/42493
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61-67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>
- Ghoreishi, G., Alemzadeh, A., Mojarrad, M., & Djavaheri, M. (2017). Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustainable Environment Research*, 27(4), 195-202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.002>
- Gibb, B. C. (2019). Plastics are forever. *Nature Chemistry*, 11(5), 394-395. doi:10.1038/s41557-019-0260-7
- Gray, N. D., Sherry, A., Hubert, C., Dolfing, J., & Head, I. M. (2010). Chapter 5 - Methanogenic Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Subsurface Environments: Remediation, Heavy Oil Formation, and Energy Recovery. In A. I. Laskin, S. Sariaslani, & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 72, pp. 137-161): Academic Press.
- Gunjan, G., Vishwas, M., Payal, V., Ajay, K. P., & Sangeeta, N. (2014). A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 04(06). doi:10.4172/2155-9821.1000177

- Harayama, S., Kasai, Y., & Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 205-214. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.002>
- Hasanizadeh, P., Moghimi, H., & Hamed, J. (2018). Biosurfactant production by *Mucor circinelloides*: Environmental applications and surface-active properties. *Engineering in Life Sciences*, 18(5), 317-325. doi:<https://doi.org/10.1002/elsc.201700149>
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar Pollut Bull*, 64(1), 7-12. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.11.006
- Herzog, M., Tiso, T., Blank, L. M., & Winter, R. (2020). Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(11), 183431. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183431>
- Irorere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., & Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10), 3941-3951. doi:10.1007/s00253-017-8262-0
- Ishaq, U., Akram, M., Iqbal, Z., Rafiq, M., Akrem, A., Nadeem, M., Shafi, F., Shafiq, Z., Mahmood, S., & Baig, M. (2015). Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 119. doi:10.1111/jam.12929
- ITOPF. (2011). *Use of dispersants to treat oil spills*.
- ITOPF. (2022). Oil Tanker Spill Statistics 2021.
- Ivanković, T., & Hrenović, J. (2010). Surfactants in the environment. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(1), 95-109.
- Jaekel, U., Musat, N., Adam, B., Kuypers, M., Grundmann, O., & Musat, F. (2013). Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps. *The ISME Journal*, 7(5), 885-895. doi:10.1038/ismej.2012.159
- Janbandhu, A., & Fulekar, M. H. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1), 333-340. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.034>
- Jimoh, A. A., Senbadejo, T. Y., Adeleke, R., & Lin, J. (2021). Development and Genetic Engineering of Hyper-Producing Microbial Strains for Improved Synthesis of Biosurfactants. *Molecular Biotechnology*, 63(4), 267-288. doi:10.1007/s12033-021-00302-1
- Joshi Navare, K., Singh, P., & Prabhune, A. (2014). New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116. doi:10.1002/ejlt.201300363
- Kanan, R. (2012). *Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement aquatique: Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques*.
- Khandelwal, A., Singh, S. B., Sharma, A., Nain, L., Varghese, E., & Singh, N. (2021). Effect of surfactant on degradation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. mediated crude oil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14. doi:10.1080/03067319.2021.1879800
- Kim, D., Kim, Y.-S., Kim, S.-K., Kim, S. W., Zylstra, G. J., Kim, Y. M., & Kim, E. (2002). Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Applied and environmental microbiology*, 68(7), 3270-3278. doi:10.1128/AEM.68.7.3270-3278.2002

- Kim, J. S., In Kyoung, L., & Bong Sik, Y. (2015). A Novel Biosurfactant Produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a Tiger Lily Wild Flower, *Lilium lancifolium* Thunb. *PloS one*, 10(4), e0122917. doi:10.1371/journal.pone.0122917
- Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Rajeetha Ravji, T., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 250-256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>
- Kleindienst, S., Paul, J. H., & Joye, S. B. (2015). Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 388-396. doi:10.1038/nrmicro3452
- Konan, K. E. (2018). *Les risques liés au transport maritime : étude sur la sécurité et la sûreté maritimes*. Retrieved from <http://www.theses.fr/2018PA01D003/document> Available from <http://www.theses.fr/2018PA01D003>
- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2008). Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci*, 57(6), 359-369. doi:10.5650/jos.57.359
- Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS microbiology*, 3(1), 25-49. doi:10.3934/microbiol.2017.1.25
- Krishnan, N., Velramar, B., & Velu, R. K. (2019). Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxicogenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155, 101-107. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.010>
- Kulakovskaya, T. V., Golubev, W. I., Tomashevskaya, M. A., Kulakovskaya, E. V., Shashkov, A. S., Grachev, A. A., Chizhov, A. S., & Nifantiev, N. E. (2010). Production of Antifungal Cellobiose Lipids by *Trichosporon porosum*. *Mycopathologia*, 169(2), 117-123. doi:10.1007/s11046-009-9236-2
- Kumar, G., Prasad, J. S., Suman, A., & Pandey, G. (2019). Chapter 16 - Bioremediation of petroleum hydrocarbon-polluted soil using microbial enzymes. In P. Bhatt (Ed.), *Smart Bioremediation Technologies* (pp. 307-317): Academic Press.
- Larpent, C. (1995). Tensioactifs. *Techniques de l'ingénieur Caractérisation et propriétés de la matière, base documentaire : TIP510WEB*(ref. article : k342). doi:<https://doi.org/10.51257/a-v1-k342>
- Launen, L. A., Pinto, L. J., & Moore, M. M. (1999). Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(4), 510-515. doi:10.1007/s002530051425
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons-Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4), 856. doi:10.3390/molecules25040856
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), 305-315. doi:10.1128/mr.54.3.305-315.1990
- Leitão, A. L. (2009). Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International journal of environmental research and public health*, 6(4), 1393-1417. doi:10.3390/ijerph6041393
- Li, G., Yi, X., Jiang, J., Zhang, Y., & Li, Y. (2020). Dynamic surface properties and dilational rheology of acidic and lactonic sophorolipids at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195, 111248. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111248>

- Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-R., & Penttilä, M. (2001). The Hydrophobins HFB1 and HFBII from *Trichoderma reesei* Showing Efficient Interactions with Nonionic Surfactants in Aqueous Two-Phase Systems. *Biomacromolecules*, 2(2), 511-517. doi:10.1021/bm0001493
- Little, D. I., Sheppard, S. R. J., & Hulme, D. (2021). A perspective on oil spills: What we should have learned about global warming. *Ocean & Coastal Management*, 202, 105509. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2020.105509>
- Liu, Y., Koh, C., & Ji, L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*, 102, 3927-3933. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.115
- Louati, H. (2013). *Etude de la biorémédiation de sédiments contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques : impact écologique sur la microflore et la meiofaune de la lagune de Bizerte*. Retrieved from <http://www.theses.fr/2013MON20118/document> Available from <http://www.theses.fr/2013MON20118>
- Lourenço, L. A., Alberton Magina, M. D., Tavares, L. B. B., Guelli Ulson de Souza, S. M. A., García Román, M., & Altmajer Vaz, D. (2018). Biosurfactant production by *Trametes versicolor* grown on two-phase olive mill waste in solid-state fermentation. *Environ Technol*, 39(23), 3066-3076. doi:10.1080/09593330.2017.1374471
- Luft, L., Confortin, T. C., Todero, I., Zabot, G. L., & Mazutti, M. A. (2020). An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1059-1080. doi:10.1080/07388551.2020.1805405
- Luna, A., Esparza García, F., Cañizares-Villanueva, R., & Rodriguez Vazquez, R. (2007). Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochemistry*, 42, 310-314. doi:10.1016/j.procbio.2006.08.015
- Luna, J., Rufino, R., Jara, A., Brasileiro, P., & Sarubbo, L. (2015). Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 413-418. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.12.014
- Mariani, L., De Pascale, D., Faraponova, O., Tornambè, A., Sarni, A., Giuliani, S., Ruggiero, G., Onorati, F., & Magaletti, E. (2006). The use of a test battery in marine ecotoxicology: the acute toxicity of sodium dodecyl sulfate. *Environ Toxicol*, 21(4), 373-379. doi:10.1002/tox.20204
- Marín, F., Navarrete, H., & Narvaez-Trujillo, A. (2018). Total petroleum hydrocarbon degradation by endophytic fungi from the Ecuadorian Amazon. *Advances in Microbiology*, 8(12), 1029-1053.
- Massé, C. (2014). *Effects of bioturbation on the diversity of bacterial communities in the sediment : experimental and in situ approaches : from Melina palmata to the West Gironde mud patch*
Effets de la bioturbation sur la diversité des communautés bactériennes du sédiment : approches expérimentale et in-situ : de Melinna palmata aux communautés de la vasière Ouest-Gironde. Université de Bordeaux, Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01146799> (2014BORD0039)
- Maugeri, L. (2006). *The Age of Oil: The Mythology, History, and Future of the World's Most Controversial Resource*: ABC-CLIO, LLC.
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- McKew, B. A., Coulon, F., Yakimov, M. M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C. J., Osborn, A. M., Timmis, K. N., & McGinity, T. J. (2007). Efficacy of intervention strategies

for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1562-1571.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01277.x>

- Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Cunha Tarouco, P., Weyrauch, P., Dong, X., & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 92-118. doi:10.1159/000441358
- Merlin, F., Zhu, Z., Yang, M., Chen, B., Lee, K., Boufadel, M., Isaacman, L., & Zhang, B. (2021). Dispersants as marine oil spill treating agents: a review on mesoscale tests and field trials. *Environmental Systems Research*, 10. doi:10.1186/s40068-021-00241-5
- Mittal, A., & Singh, P. (2009). Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian J Exp Biol*, 47(9), 760-765.
- Miyasaka, T., Asami, H., & Watanabe, K. (2006). Impacts of Bioremediation Schemes on Bacterial Population in Naphthalene-Contaminated Marine Sediments. *Biodegradation*, 17(3), 227-235. doi:10.1007/s10532-005-5018-9
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2013). Accumulation of cellobiose lipids under nitrogen-limiting conditions by two ustilaginomycetous yeasts, *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma hubeiensis*. *FEMS Yeast Res*, 13(1), 44-49. doi:10.1111/1567-1364.12005
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2015). Mannosylerythritol lipids: production and applications. *J Oleo Sci*, 64(2), 133-141. doi:10.5650/jos.ess14185
- Morita, T., Ishibashi, Y., Hirose, N., Wada, K., Takahashi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, H., Abe, M., & Kitamoto, D. (2011). Production and Characterization of a Glycolipid Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid B, from Sugarcane Juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(7), 1371-1376. doi:10.1271/bbb.110221
- Muriel, J. M., Bruque, J. M., Olías, J. M., & Jiménez-Sánchez, A. (1996). Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. *Biotechnology Letters*, 18(3), 235-240.
- Myers, D. (2005). Surfactant Science and Technology, Third Edition. *Surfactant Science and Technology, 3rd Edition*, by Drew Myers, pp. 400. ISBN 0-471-68024-9. Wiley-VCH, October 2005. doi:10.1002/047174607X.ch5
- Nalini, S., & Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresource Technology*, 173, 231-238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.051>
- Oliveira, M., Magri, A., Baldo, C., Camilios-Neto, D., Minucelli, T., Antonia, M., & Celligoi, M. A. (2015). Review: Sophorolipids A Promising Biosurfactant and it's Applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*, 6, 161-174.
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicol Environ Saf*, 169, 615-622. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.081
- Paraszkiewicz, K., Kanwal, A., & Długonski, J. (2002). Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol*, 92(3), 287-294. doi:10.1016/s0168-1656(01)00376-5
- Pele, M. A., Ribeaux, D. R., Vieira, E. R., Souza, A. F., Luna, M. A. C., Rodríguez, D. M., Andrade, R. F. S., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Barreto-Bergter, E., Santiago, A. L. C. M. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal

- of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 40-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.12.003>
- Perdigão Mendes, R., Almeida, C. M., Santos, F., Carvalho, M., & Mucha, A. (2020). Optimization of an Autochthonous Bacterial Consortium Obtained from Beach Sediments for Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. *Water*, 13, 66. doi:10.3390/w13010066
- Pettersson, A., Adamsson, M., & Dave, G. (2000). Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere*, 41(10), 1611-1620. doi:10.1016/s0045-6535(00)00035-7
- Piegza, M., Pietrzykowska, J., Trojan-Piegza, J., & Łaba, W. (2021). Biosurfactants from *Trichoderma* Filamentous Fungi-A Preliminary Study. *Biomolecules*, 11(4), 519. doi:10.3390/biom11040519
- Pimsee, P. (2014). *Étude du comportement des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) lors du déversement accidentel d'hydrocarbures en eaux continentales*. (PhD Thesis). Retrieved from <https://oatao.univ-toulouse.fr/12235/>
- Pitocchi, R., Cicatiello, P., Birolo, L., Piscitelli, A., Bovio, E., Varese, G. C., & Giardina, P. (2020). Cerato-Platanins from Marine Fungi as Effective Protein Biosurfactants and Bioemulsifiers. *International journal of molecular sciences*, 21(8). doi:10.3390/ijms21082913
- Prenafeta-Boldú, F. X., de Hoog, G. S., & Summerbell, R. C. (2018). Fungal Communities in Hydrocarbon Degradation. In T. J. McGenity (Ed.), *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology* (pp. 1-36). Cham: Springer International Publishing.
- Prince, R. C. (2015). Oil Spill Dispersants: Boon or Bane? *Environmental Science & Technology*, 49(11), 6376-6384. doi:10.1021/acs.est.5b00961
- Qazi, M. A., Kanwal, T., Jadoon, M., Ahmed, S., & Fatima, N. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. *Biotechnology Progress*, 30(5), 1065-1075. doi:<https://doi.org/10.1002/btpr.1933>
- Ramalingam, V., Varunkumar, K., Ravikumar, V., & Rajaram, R. (2019). Production and structure elucidation of anticancer potential surfactin from marine actinomycete *Micromonospora marina*. *Process Biochemistry*, 78, 169-177. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.002>
- Rangarajan, V., Dhanarajan, G., & Sen, R. (2015). Bioprocess design for selective enhancement of fengycin production by a marine isolate *Bacillus megaterium*. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 147-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.016>
- Reis, C., Morandini, L. M. B., Bevilacqua, C. B., Bublitz, F., Ugalde, G., Mazutti, M. A., & Jacques, R. J. S. (2018). First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 49 Suppl 1(Suppl 1), 185-192. doi:10.1016/j.bjm.2018.04.004
- Rocha, C. A., Pedregosa, A. M., & Laborda, F. (2011). Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB Express*, 1(1), 9. doi:10.1186/2191-0855-1-9
- Roy, S., Hens, D., Biswas, D., Biswas, D., & Kumar, R. (2002). Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 575-581. doi:10.1023/A:1016362819746
- Sa, R. B., An, X., Sui, J. K., Wang, X. H., Ji, C., Wang, C. Q., Li, Q., Hu, Y. R., & Liu, X. (2018). Purification and structural characterization of fengycin homologues produced

- by *Bacillus subtilis* from poplar wood bark. *Australasian Plant Pathology*, 47(3), 259-268. doi:10.1007/s13313-018-0552-1
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., & Pandey, A. (2015). Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource Technology*, 191, 133-139.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.126>
- Salek, K., & Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, 85, 143-155.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>
- Salleh, A. B., Farinazleen, M. G., Zaliha, R., Rahman, R., & Basri, M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 411-425.
- Sanches, M., Santos, R., Cortez, A., Mariner, R., & Souza, J. (2018). Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* (Kunth) as Substrate. *Biotechnology Journal International*, 21, 1-9.
doi:10.9734/BJI/2018/39405
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Salgueiro, A. A., & Sarubbo, L. A. (2013). Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105(Complete), 43-50. doi:10.1016/j.petrol.2013.03.028
- Saraswathy, A., & Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 227-232.
doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11185.x
- Saravanakumari, P., & Mani, K. (2010). Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresource Technology*, 101(22), 8851-8854.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.104>
- Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Baik, S.-H., & Yun, S.-E. (2008). Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 36(1), 92-96.
doi:<https://doi.org/10.1002/clen.200700042>
- Sayed, K., Baloo, L., & Sharma, N. K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International journal of environmental research and public health*, 18(5), 2226. doi:10.3390/ijerph18052226
- Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Zgoła-Grześkowiak, A., Wolko, Ł., Sydow, Z., Kaczorowski, Ł., Powierska-Czarny, J., & Cyplik, P. (2019). The impact of natural and synthetic surfactants on bacterial community during hydrocarbon biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 191-199.
doi:10.1016/j.ibiod.2019.05.010
- Stauffert, M. (2011). Dynamique des communautés microbiennes en réponse à une contamination pétrolière dans des sédiments bioturbés.
- Stevens, N. P. (1956). Origin of Petroleum—A Review1. *AAPG Bulletin*, 40(1), 51-61.
doi:10.1306/5CEAE2F8-16BB-11D7-8645000102C1865D
- Tao, K., Liu, X., Chen, X., Hu, X., Cao, L., & Yuan, X. (2017). Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. *Bioresour Technol*, 224, 327-332. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.073
- Taylor, H. H. (1994). *Fertilizer Use and Price Statistics*, 1960-93. Retrieved from <https://ageconsearch.umn.edu/record/154834/files/sb893.pdf>

- Terrisse, F. (2014). *Influence des oscillations anoxie/oxie sur des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes de sédiments intertidaux*. Retrieved from <http://www.theses.fr/2014PAUU3056/document> Available from <http://www.theses.fr/2014PAUU3056>
- Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2004). Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida iшиwаде*. *J Appl Microbiol*, 96(3), 588-592. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02202.x
- Tissot, P., & Welte, D. (1984). *Petroleum formation and occurrence*: Springer.
- UNCTAD. (2018). *Review of Maritime Transport 2018*: United Nations.
- UNCTAD. (2019). *Review of Maritime Transport 2019*: United Nations.
- UNCTAD. (2020). *Review of Maritime Transport 2020*: United Nations.
- UNCTAD. (2021). *Review of Maritime Transport 2021*: United Nations.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), 503-549. doi:10.1128/mmbr.67.4.503-549.2003
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., & Upasani, V. N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 116-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.030>
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 222, 195-201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>
- Vassiliou, M. S. (2009). *The A to Z of the Petroleum Industry* (Vol. 116): Scarecrow Press.
- Velioglu, Z., & Ozturk Urek, R. (2015). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 526-531. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.007>
- Warne, M. S., & Schifko, A. D. (1999). Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf*, 44(2), 196-206. doi:10.1006/eesa.1999.1824
- Wauquier, J.-P. (1995). *Petroleum Refining: Crude oil, petroleum products, process flowsheets* (Vol. 1): Editions Technip.
- White, H. K., Hsing, P.-Y., Cho, W., Shank Timothy, M., Cordes Erik, E., Quattrini Andrea, M., Nelson Robert, K., Camilli, R., Demopoulos Amanda, W. J., German Christopher, R., Brooks James, M., Roberts Harry, H., Shedd, W., Reddy Christopher, M., & Fisher Charles, R. (2012). Impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20303-20308. doi:10.1073/pnas.1118029109
- Widdel, F., Knittel, K., & Galushko, A. (2010). Anaerobic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms: An Overview. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1997-2021). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259-276. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3)
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T., & Rabus, R. (2016). Metabolism of Hydrocarbons in n-Alkane-Utilizing Anaerobic Bacteria. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 138-151. doi:10.1159/000442160
- Xaaldi Kalhor, A., Movafeghi, A., Mohammadi-Nassab, A. D., Abedi, E., & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil

- hydrocarbons. *Mar Pollut Bull*, 123(1-2), 286-290.
doi:10.1016/j.marpolbul.2017.08.045
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257-266.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.04.006>
- Zafra, G., Moreno-Montaño, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1034-1042. doi:10.1007/s11356-014-3357-y
- Zhan, Y., Ma, N., Liu, R., Wang, N., Zhang, T., & He, L. (2019). Polymyxin B and polymyxin E induce anaphylactoid response through mediation of Mas-related G protein-coupled receptor X2. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 304-311.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.014>
- Zhu, Z., Song, X., Cao, Y., Chen, B., Lee, K., & Zhang, B. (2022). Recent advancement in the development of new dispersants as oil spill treating agents. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 36, 100770. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100770>

Titre : Exploration du potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons et valorisation dans la lutte contre les pollutions marines

Mots clés : bio-tensioactifs, champignons, écologie, biotechnologie

Résumé : Le XXème siècle a fait face à un grand nombre d'accidents maritimes, ayant conduit à des déversements d'hydrocarbures en mer. Une technique de lutte pouvant être utilisée pour faire face à ces pollutions est la dispersion. Elle permet la formation de micelles grâce aux tensioactifs constituant les dispersants. Ces micelles vont s'épandre dans la colonne d'eau et leur biodégradation par des microorganismes hydrocarbonoclastes sera facilitée. Les tensioactifs, largement utilisés de nos jours tendent néanmoins à être remplacés par des bio-tensioactifs, qui sont eux synthétisés par des microorganismes comme les champignons et qui s'avèrent moins toxiques pour la faune et la flore marines et potentiellement tout autant efficaces que leurs homologues pétrochimiques.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'explorer le potentiel de production de bio-tensioactifs par des champignons. Dans un premier temps, ce potentiel de production a été démontré chez des champignons appartenant au phylum des Mucoromycota. Ensuite, la diversité fongique retrouvée dans 4 sites contaminés aux hydrocarbures en Bretagne et la capacité de certains champignons à produire des bio-tensioactifs ont été révélées. Enfin, une souche de *Trichoderma citrinoviride* ayant révélé un réel potentiel a été sélectionnée. Après optimisation du milieu de culture, son activité surfactante a été caractérisée et l'efficacité de dispersion du pétrole d'extraits issus de cette souche a été évaluée à une échelle laboratoire. Ces travaux ont confirmé que les champignons peuvent constituer une source potentielle de bio-tensioactifs.

Title : Exploration of the potential for the production of biosurfactants by fungi and their use in the fight against marine pollution

Keywords : biosurfactants, fungi, ecology, screening

Abstract : During the 20th century, a large number of maritime accidents has occurred, leading to significant oil spills at sea. Dispersion is one of the technique used to face oil spills, allowing to the formation of micelles, thanks to the surfactants present in the dispersants. These micelles spread in the water column and their biodegradation by hydrocarbonoclastic microorganisms is then facilitated. Surfactants, which are widely used nowadays, could be replaced by biosurfactants, which are synthesized by microorganisms such as fungi and are less toxic for marine fauna and flora and yet still as effective as the petrochemical ones.

In this context, the objective of this PhD. thesis was to explore biosurfactant production in fungi. First, their production potential was demonstrated in fungi from the Mucoromycota phylum. Then, the fungal diversity present in oil-contaminated sites in Brittany and the ability of certain members of these communities to produce such compounds were revealed. Finally, a promising strain of *Trichoderma citrinoviride* was selected to further study its potential. After optimizing culture medium composition, its surfactant activity was characterized and the dispersion efficiency of crude extracts from this strain was evaluated at a laboratory scale. Overall, this study confirmed that fungi can be source of biosurfactants.