

IUT Génie Biologique de Dijon
Université de Bourgogne Franche Comté
BUT Biologie Médicale et Biotechnologie

Thevenet Antoine

**Isolation, Identification moléculaire et potentiel
biotechnologique des levures marines à partir de culture de
microalgues**

Biological Science Research Group (BSRG)
IBB-Institute or Bioengineering and Biosciences
Instituto Superior Técnico, Tour Sud
Av. Rovisco Pais
1049-001 Lisbonne
Portugal

Responsable du laboratoire : **Pr. Isabel Sá-Correia**
Maître de stage : **Pr. Isabel Sá-Correia**



2023 - 2024

Année 2023-2024

IUT Génie Biologique de Dijon
Université de Bourgogne Franche Comté
BUT Biologie Médicale et Biotechnologie

Thevenet Antoine

Isolation, Identification moléculaire et potentiel biotechnologique des levures marines à partir de culture de microalgues

Biological Science Research Group (BSRG)
IBB-Institute of Bioengineering and Biosciences
Instituto Superior Técnico, Tour Sud
Av. Rovisco Pais
1049-001 Lisbonne
Portugal

Responsable du laboratoire : **Pr. Isabel Sá-Correia**
Maître de stage : **Pr. Isabel Sá-Correia**



Remerciement

Je voudrais d'abord remercier en premier le Professeur Isabel Sá-Correia, responsable du groupe en « Physiological Genomics and Biodiversity of yeasts for Sustainable Bioeconomy » dans le Groupe de Recherche en Science Biologique de l'Institute for Bioengineering and Biosciences (iBB), pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et me faire intégrer une équipe de recherche.

Un grand remerciement aussi à Madalena Matos et Mónica Fernandes pour leur encadrement tout au long de ce stage, elles ont pu faire preuve de patience et de disponibilité, tout en étant vraiment pédagogue. J'ai pu apprendre énormément de choses qui pourront me servir dans le cadre de la vie personnel et j'en suis très reconnaissant. Je leur souhaite de toujours garder leur enseignement dans la même bonne humeur que celle que j'ai pu apprécier tous les jours avec eux.

Je remercie la compagnie de microalgues Necton (<https://necten.pt/>) et CCMAR (<https://ccmar.ualg.pt>) m'ayant permis d'obtenir des échantillons pour l'isolement des levures.

Je souhaite remercier aussi le financement du projet N°C644915664-00000026-Blue Bioeconomy Pact (Algae Vertical) par le PRR-République portugaise et Union européenne .

Enfin, je remercie les autres personnes de l'équipe pour leur présence quotidienne et leurs conseils.

Assinado por: **Isabel Maria de Sá Correia Leite de Almeida**
Num. de Identificação: 02446084
Data: 2024.06.28 18:11:56+01'00'



Abréviations

YPD	Y east- E xtract P eptone D extrose
CAM	C hloramphénicol
OD (DO)	O ptical D ensity (Densité Optique)
ASW	A rtificial S ea W ater (Eau de mer artificiel)
DNA (ADN)	D eoxyribo N ucleic A cid(Acide DésoxyriboNucléique)
ITS	I nternal T ranscribed S pacer (Espaceur interne transcrit)
PCR(RCP) Polymérase)	P olymerase C hain R eaction(Réaction en Chaîne par Polymérase)
EDTA	E thylene D iamine T etraacetic A cid
SDS	S odium D odécyl S ulfate
rpm	R evolutions P er M inute (rotations par minute)
YNB	Y east N itrogen B ase
CFU(UFC)	C olony- F orming U nits (Unité Formant Colonie)
RFU Relative)	R elative F luorescence U nit (Unité de la Fluorescence Relative)
RNA(ARN)	R ibo N ucleic A cid (Acide Ribonucléique)
BLAST	B asic L ocal A lignement S earch T ools
NCBI	N ational C enter of B iotchnology Information

Sommaire

1.Introduction	
1.1Produits et applications des microalgues :	1
1.2 Produits et Applications des levures :	2
2.Matériel et Méthode	3
2.1 Introduction des échantillons	3
2.2 Isolation des levures et bactéries :	4
2.3 Extraction ADN, amplification et séquençage	5
2.3.1 Extraction ADN et amplification pour les levures	5
2.3.2 Extraction ADN et amplification pour les bactéries	6
2.3.3 Purification et séquençage	6
2.4 Etudes des propriétés	7
2.4.1 Courbe de croissance	7
2.4.2 Evaluation de la production de lipides	7
2.4.3 Métabolisme des sources de carbone	7
3.Résultats	8
3.1Isolation des levures/bactéries	8
3.2 Identification des levures isolées	9
3.3 Identification des bactéries résistantes isolées	10
3.4 Courbe de croissance	11
3.5 Résultat de la production de lipides	12
3.6 Résultat du métabolisme des sources de carbone	13
3.7 Résultat production de biosurfactant	14
4.Discussion	15
5.Conclusion	17
6.Bibliographie	18

1.Introduction

Les algues et les levures marines sont des organismes naturellement présents dans les eaux. Ces deux organismes coexistent dans le même milieu et ce depuis longtemps et peuvent vivre en symbiose ou en mutualisme permettent alors de bénéficier l'un de l'autre (Loque et al., 2010a).

Parmi les algues, il en existe deux types différents, à savoir les macroalgues et les microalgues. Ce qui différencie ces deux types sont leur composition moléculaire. Les microalgues (unicellulaire) composant le phytoplancton se basant au début de la chaîne alimentaire. Elles se déplacent dans l'eau et leur taille varie de quelques micromètres (μm) à quelques centaines de μm , en fonction des espèces ((Tan et al. 2020). Ces deux types d'algues sont photosynthétiques, elles vont donc se servir du soleil comme source d'énergie. Elles sont employées dans le domaine de l'aquaculture où elles constituent la nourriture de nombreux animaux ou en tant qu'engrais. Tandis que les macroalgues (multicellulaire) elles sont de plus grande taille (plusieurs cm) servant aussi pour l'alimentation de certains animaux ((Pereira 2021). Nous nous intéresserons aux microalgues dans le cadre de notre étude.

Les microalgues sont des organismes vivants qui ont la capacité de se développer très rapidement et peuvent donc doubler leur masse en un jour. Toutes les microalgues sont « autotrophiques », c'est-à-dire qu'elles sont capables de synthétiser elles-mêmes les matières organiques qui les composent à partir d'éléments minéraux par photosynthèse par exemple. À savoir aussi que des microalgues peuvent aussi se servir de matière organique issue d'autres organismes, on les appelle alors « hétérotrophes » comme les bactéries ou les levures. Elles peuvent donc ces deux voies trophiques comme source de nourriture.

À savoir que les microalgues sont un des éléments essentiels de la biologie marine et peuvent servir dans certaines applications. En effet, les microalgues ont une large gamme d'utilisation en fonction des produits qu'elles synthétisent :

1.1 Produits et applications des microalgues :

- Production de biocarburant, les lipides que les microalgues produisent permettent de le transformer en biodiesel (Gaurav et al., 2024).
- En traitement des eaux avec l'épuration par absorption des métaux lourds (Abdelfattah et al. 2023).
- En cosmétique avec la production de composés bioactifs utilisés pour les médicaments ou soins personnels (Xia et al. 2021).
- Enfin pour séquestrer le CO_2 se trouvant dans l'air afin de réduire les gaz à effet de serre (Onyeaka et al. 2021).

Les levures quant à elles sont des champignons unicellulaires microscopiques, les levures permettent de dégrader différents composés comme les sucres, faire de la fermentation et émettre des gaz. On retrouve les levures dans pleins de milieux, ici on s'intéressera au milieu marin. Les levures marines quant à elles constituent un groupe fascinant et diversifié de microorganismes qui jouent un rôle essentiel dans les écosystèmes marins. Ces eucaryotes unicellulaires sont omniprésents dans les milieux marins, eaux de surface et sédiments profonds. Leur capacité à survivre et prospérer dans diverses conditions environnementales en fait des acteurs clés pour l'élaboration de ressources prometteuses pour la biotechnologie (Tullio 2022).

En effet, l'utilisation de levures comme outil de bio production est une méthode récente et qui pourrait révolutionner dans le cadre de production de différents composés pour l'élaboration de médicament (Jung et al. 2022), la confection de biocarburant (Nakata et al. 2020) ou alors dans le cadre de l'alimentaire.

Dans le cadre d'améliorer la production des différents produits issu des levures et donc répondre à la demande, la recherche de nouvelles souches plus productives en fait un sujet majeur pour l'avenir de la biotechnologie.

1.2 Produits et Applications des levures :

- En biotechnologie, les levures marines sont utilisées pour la production de biomasse, de biocarburants et d'autres produits à valeur ajoutée. Leur capacité à produire des composés bioactifs les rend intéressantes pour des applications en bioremédiation et en santé humaine. En effet, les levures ont une grande capacité à produire des lipides (Mota, Múgica et al., 2022), notamment des acides gras, qu'elles stockent comme source d'énergie. Ces lipides peuvent être récupérés et utilisés pour la confection de biocarburants ou dans le domaine de la nutrition (Zaky et al. 2014).
- Elles ont la capacité de produire des métabolites secondaires, comme des enzymes, antibiotique [que certaines levures (Jung et al. 2022)] ou de pigment (caroténoïdes) (Martins et al., 2021) ayant certaines propriétés pour des applications dans le milieu cosmétique ou industrielle.
- Les levures marines ont aussi la capacité à dégrader certaines sources de carbones et de les transformer en produits utiles aux autres microorganismes. En effet, les levures ont un rôle de décomposeur et vont pouvoir dégrader les composés complexes (comme certaines sources de carbones) en composés plus petits et utilisables par les autres microorganismes marins comme les microalgues (Loque et al. 2010b).

Le fait d'avoir plusieurs microorganismes au sein d'un même milieu biologique permet de créer une certaine symbiose. En effet, certains cas de symbiose entre les microalgues et les levures ont été mis en évidence. Ces deux microorganismes peuvent se compléter, car ils permettent des échanges de gaz entre les microalgues rejettent le dioxygène et consomme le CO₂ tandis que les levures consomment de dioxygène et rejette du CO₂. Il y a aussi les échanges de certains métabolites ou une régulation du pH du milieu entre les deux populations (Loque et al., 2010b).

L'institut IBB (Institute for Bioengineering and Biosciences) est une unité de recherche issue de l'IST (Institute Superior Técnico) dont le but est de regrouper les disciplines de la biologie, de la chimie et de l'ingénierie pour répondre aux défis globaux afin de faire bénéficier la société. Parmi cet institut, le groupe BSRG (Biological Science Research Group) ayant pour but de comprendre les systèmes biologiques des microorganismes en appliquant plusieurs sciences biologiques (moléculaire cellulaire, biochimique, bio-informatique, etc.) afin de comprendre leurs fonctions et donc envisager plusieurs activités dans le domaine de la santé, l'industrie ou l'alimentaire.

Il se trouve que dans ce groupe, le laboratoire du Pr. Isabel Sá-Correia est inclus dedans et parmi d'autres projets, le laboratoire du Pr Isabel Sá-Correia se concentre sur l'étude des levures marines et leur application biotechnologiques au sein d'un projet (Blue Bioeconomy Pact). En effet, le but du laboratoire est d'isoler, d'identifier au niveau moléculaire les différentes levures

contenus dans la culture de microalgues issues de différentes compagnies. Après avoir identifié les différentes levures, il y a plusieurs screenings effectués sur différents aspects (productions de lipides, métabolisme de différentes sources de carbone, croissance) afin de pouvoir déterminer quel type de levure pourrait être bénéfique dans le cas d'une culture de microalgue et de sa potentielle application de probiotiques (Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021).

Dans le cadre de mon projet d'étude, je vais vous présenter la démarche afin de pouvoir isoler et identifier moléculairement les levures marines et déterminer les différentes propriétés qu'elles contiennent à partir d'échantillons de cultures de microalgues.

2. Matériel et Méthode

2.1 Introduction des échantillons

Les échantillons reçus au nombre de trois sont des échantillons de cultures de la microalgue *Nannochloropsis gaditana* issues de la compagnie Necton. On utilise cette microalgue dans le domaine de l'alimentation (poissons plus précisément) car elle a la propriété de produire et contenir beaucoup de lipides comparés à d'autres microalgues.

Ces trois échantillons proviennent de différents stades lors de la culture (Fig. 1). Le Premier échantillon (S1) correspond à la culture de la microalgue pendant 50 jours dans des « Green Wall » ayant un volume de 800 L. Le deuxième échantillon (S2) est quant à lui le milieu dans lequel les microalgues sont cultivés, il s'agit de l'eau de mer qui est a été traité par la compagnie. Et enfin le dernier échantillon (S3) correspond au passage du « Green Wall » de 800 L à un photobioréacteur faisant 19 000 L et donc l'échantillon est prélevé le jour même après inoculum du photobioréacteur (Annexe 1).

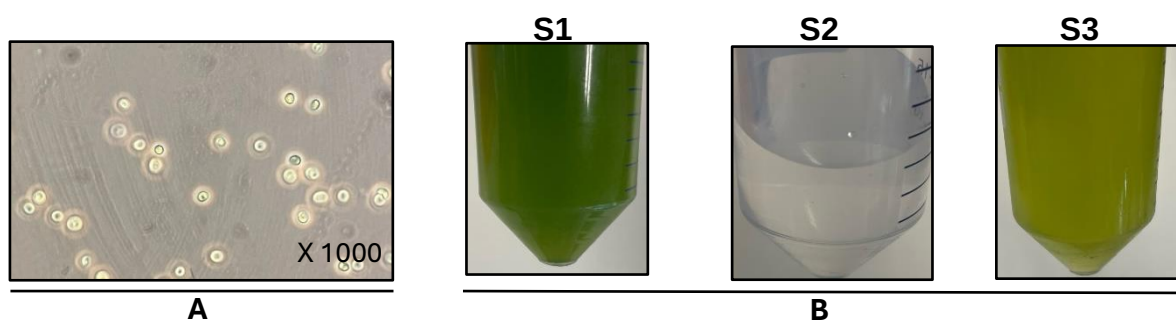


Fig 1. Photographies mettant en avant les différents aspects de la culture de *Nannochloropsis gaditana*. A – Observation de la morphologie des cellules de *Nannochloropsis gaditana* au microscope optique. B- Photos macroscopique des différents échantillons dans le cadre de la culture de *Nannochloropsis gaditana* (S1, S2, S3)

2.2 Isolation des levures et bactéries résistant au chloramphénicol (CAM) :

Une fois les échantillons observés, nous allons passer à la phase d'isolation afin de pouvoir obtenir un maximum d'espèces de levures isolées. Nous allons alors effectuer plusieurs méthodes afin d'augmenter les chances d'obtenir un maximum d'espèces de levures.

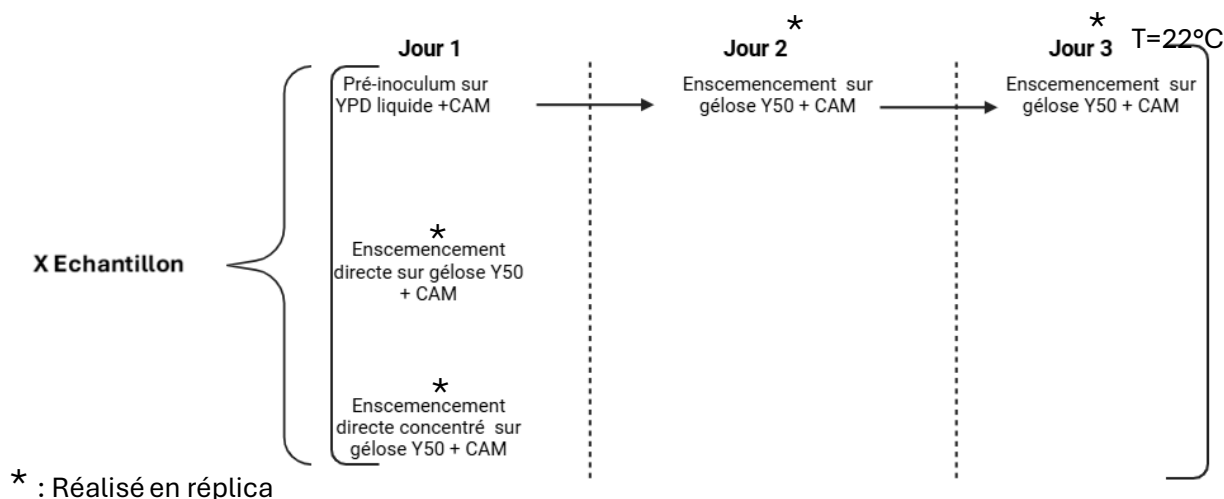


Fig 2. Schéma démontrant la démarche établie afin d'isoler les différentes levures contenues dans les échantillons

Pour l'ensemencement direct, les ensemencements ont été réalisés sur des Y50 donc un milieu YPD gélifié composé à 10 g/L d'extrait de levures (Thermo Fisher Scientific, USA), 20 g/L de peptone (Gibco), 20 g/L de Glucose (Scharlau, Espagne) et 20 g/L (NZYTech, Portugal). Ajouté à cela 50% d'ASW composé de 23,28 g/L de NaCl (Sigma), 2,41 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 1,9 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 1,11 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), 0,75 g/L de KCl (Sigma) et 0,17 g/L de NaHCO_3 . Ces milieux gélosés ont été supplémentés par du Chloramphénicol (CAM) à 100 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, USA) afin de minimiser au maximum la prolifération des bactéries. Chaque échantillon est dilué au 1/10 et un volume de 100 μL est déposé sur gélose.

Nous avons aussi réalisé une autre méthode consistant à mettre l'échantillon dans un milieu très enrichie afin de croître et considérablement la concentration en levures. Cet enrichissement correspond à 10% d'échantillon (v/v) dans un volume final de YPD supplémenté de CAM à 100 $\mu\text{g/L}$. Après une journée complète sous agitation à 22°C, une mesure de la DO à 600nm est réalisée afin de pouvoir déterminer la dilution à effectuer pour pouvoir dénombrer. Une fois la dilution réalisée et ceux pour 24h et 48h. Une fois la dilution effectuée, on ensemence à hauteur de 100 μL de milieu enrichi par gélose.

Dernière méthode consistant à concentrer nos échantillons par centrifugation. En effet, 12 mL d'échantillons vont être centrifugés à 12857 g pendant 10 min. On ressuspend ensuite le culot par de L'ASW (400 μL) afin d'obtenir un échantillon très concentré (30X). Les échantillons concentrés sont ensuite dilués au 1/10 puis ensemencer avec un volume de 100 μL .

Les ensemencements sont incubés à 22°C pendant 10 jours, s'en suit un dénombrement de chaque gélose (donné en UFC/mL). Plusieurs colonies seront ensuite sélectionnées en fonction de leur morphologie pour être observé au microscope optique. Cela nous permettra

déterminer si la colonie sélectionnée sont des levures ou des bactéries résistantes au CAM. Ces mêmes colonies vont être identifiées par biologie moléculaire (bactéries et levures) afin d'identifier l'espèce.

2.3 Extraction ADN, amplification et séquençage

2.3.1 Extraction de l'ADN des levures et amplification

Pour l'extraction de l'ADN, les levures sont re-suspendues dans 200 µL de tampon de lyse (50 mM Tris, 50 mM EDTA (Sigma), 250 mM NaCl, 0,3 % SDS (Sigma) dans un tube. Des billes de verre de 0,5 mm de diamètre ont été ajoutées à cette suspension. Le mélange a été vortexé pendant 2 minutes pour lyser les cellules, puis incubé à 65 °C pendant une heure. Ensuite, la suspension a été placée sur glace pendant 10 minutes et vortexé de nouveau pendant 2 minutes. La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 15 minutes à 15294 g à 4 °C. Le surnageant obtenu a été transféré dans un tube Eppendorf propre de 1,5 mL. Pour précipiter l'ADN, 1/10 de volume de Na Acétate de sodium (Sigma) 3 M (pH 4,8) et 2 volumes d'éthanol absolu (-20 °C) ont été ajoutés au surnageant. La solution a été incubée pendant au moins 30 minutes à -80 °C ou toute la nuit à -20 °C. Après incubation, la solution a été centrifugée pendant 20 minutes à 15294 g à 4 °C. Le surnageant a été éliminé, et le culot d'ADN a été lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % (-20 °C). Le mélange a été centrifugé à nouveau pendant 5 minutes à 15000 rpm à 4 °C. Le pellet d'ADN a ensuite été séché sous vide dans un SpeedVac à 45 °C pendant 15 minutes, puis re-suspendu dans 100 µL d'eau sans ADNase /ARNase. La quantification de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop. L'ADN extrait a été conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

On amplifie ensuite l'ADN de levure par PCR en utilisant l'ADN polymérase PHUSION (Thermo Fischer Scientific), le Mix pour la PCR a été préparé selon les spécifications de l'enzyme. Les amorces utilisées ici, seront les amorces D1/D2 qui se fixe sur la région 26S ribosomale et les amorces ITS (Palma et al. 2022). L'ITS quant à lui se trouve entre les petites et grandes sous-unités des séquences génétiques de l'ARN ribosomique (Palma et al. 2022)

D1/D2 primer

5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

ITS primer

5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Programme PCR

Dénaturation initial	98°C pour 30s	X35
Dénaturation initial	98°C pour 10s	
Hybridation	52°C pour 20s	
Elongation	72°C pour 30s	
Elongation finale	72°C pour 8min	

2.3.2 Extraction ADN et amplification pour les bactéries

Pour l'extraction ADN chez les bactéries, une colonie est re-suspendue dans 50 µL d'eau stérile. Le tube est ensuite mis dans de l'eau en ébullition pendant 3 min et centrifugé à 9700 g pendant 2 min. Un volume de 20 µL de surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube, on mesure ensuite la concentration en ADN par Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop One).

L'ADN extrait est ensuite amplifié par PCR en utilisant l'ADN polymérase PHUSION. La région à amplifier se trouve la région 16S qui est une région qui constitue la sous-unité des ribosomes procaryotes et donc la région peut varier en fonction de l'espèce. Les amorces utilisées ici sont F27 et R1469.

16S primer

5'-AGA GTT TGA TCG TGG CTC AG-3'

5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3'

Programme PCR

Dénaturation initial	98°C pour 5min	X35
Dénaturation initial	98°C pour 30s	
Hybridation	50°C pour 30s	
Elongation	72°C pour 1min30s	
Elongation finale	72°C pour 10min	

2.3.3 Purification et séquençage

Une fois l'amplification est réalisée que cela soit levures ou bactéries, un gel d'agarose à 0,8% (m/v) (NZYTech, Portugal) est réalisé afin d'effectuer une électrophorèse dans du tampon 1X TAE (BioRad, USA) en utilisant du NZY DNA ladder III (NZYTech), 6X Orange DNA Loading Dye (Thermoscientific) et un intercalant (RedSafe, USA) dans un courant de 100V pendant 3 min. Le but d'éliminer les résidus de la PCR et aussi d'analyser si l'amplification a été spécifique. Une fois l'électrophorèse terminée et prouvé que l'amplification a été spécifique, la bande représentant la région amplifiée est découpée dans le gel. L'ADN est purifié grâce à la colonne du kit NZYGelpure (NZYTech) tout en suivant le protocole indiqué (Annexe 2).

Les séquences d'ADN purifiées sont ensuite séquencées grâce à la méthode Sanger en possible grâce au partenariat avec l'Institut Gulbenkian of Science (IGC) nous permettant après de faire du BLAST dans la banque de séquence du NCBI et donc de pouvoir déterminer l'espèce.

2.4 Etudes des propriétés

2.4.1 Courbe de croissance

Dans le cadre d'établir une courbe de croissance, on effectue déjà un pré-inoculum dans du YPD (30°C ou 22°C) toute une nuit des différentes levures isolées puis on ensemence les levures à raison de 1 en DO dans 20 mL d'un milieu minimum stérile contenant 30 g/L Glucose, YNB 1X (Sigma) et de l'eau stérile à pH 5,5. Les cultures sont ensuite mises sous agitation à 30°C et 22°C pour certaines colonies isolées. Une mesure de la DO est ensuite réalisée deux fois tous les jours. Les cultures effectuées pour déterminer la courbe de croissance seront réutilisées pour les autres techniques.

2.4.2 Evaluation de la production de lipides

L'évaluation de la production de lipides a été réalisée en utilisant le protocole de Fernandes et al., 2023. La coloration au Nile Red (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été collectées par centrifugation (2400× g, 3 min) jusqu'à une DO600 nm finale de 1,5. Le culot a été re-suspendu et lavé deux fois avec une solution de NaCl à 0,9 % (p/v). Après les étapes de lavage, les culots ont été re-suspendus dans du tampon phosphate salin (PBS ; 1X, pH 7,4, contenant 8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂ HPO₄ (Sigma) et 0,24 g/L de KH₂ PO₄ (Sigma) puis incubés à 50 °C pendant 30 minutes. Un total de 200 microlitres de la suspension cellulaire a été transféré dans une plaque noire à fond transparent de 96 puits (Thermo Fisher Scientific) pour mesurer la densité optique des cellules à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques multi-mode FilterMax F5 (Molecular Devices, USA). Les suspensions cellulaires ont été colorées avec du Nile Red à une concentration finale de 2,5 µg/mL et les unités de fluorescence relative (RFU) ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaques multi-mode FilterMax F5 utilisant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 535 et 625 nm, respectivement. Pour obtenir les valeurs finales des unités de fluorescence relative, les valeurs de fluorescence de fond ont été soustraites : cellules avec PBS sans Nile Red pour éliminer l'autofluorescence du tampon, et PBS avec Nile Red. Une étape de normalisation de la fluorescence à la DO595 nm a également été effectuée pour prendre en compte la variation de la concentration cellulaire.

2.4.3 Métabolisme des sources de carbone

Des géloses composées seulement de l'agar à 20 g/L et de YNB 1X, les sources de carbone qui nous intéressent, à savoir le glycérol à 1,5% (v/v), la xylose à 20 g/L et le méthanol à 1,5% (v/v). Ces trois sources de carbone sont communes et permettent de mettre en évidence la capacité de différentes levures à décomposer les composés complexes. On va alors déposer une goutte (10 µL) de culture de levures de 1DO et laisser incuber 72 h à 30/22°C.

2.4.4 Production en biosurfactant : «Oil displacement test »

Ce test issu de la publication de Petra de Oliveira Barros et al., 2024 a été réalisé en déposant 20 ml d'eau dans une boîte de pétri, suivi de 1 mL d'huile (mix d'huile de moteur usagé avec huile de moteur propre) déposé à la surface de l'eau. Enfin, la culture issue de la courbe de

croissance fût utilisée une semaine après inoculation, la culture a alors été centrifugée à 3300 g pendant 3 min puis 40 µL du surnageant a été déposé sur la goutte lipidique. Le diamètre d'émulsification fût mesuré 2 min après. On utilise comme contrôle positif une solution de SDS 1% (m/v) et comme contrôle négatif le milieu de culture minimum utilisé lors de culture des lipides.

3. Résultats

3.1 Isolation des levures/bactéries résistant à chloramphénicol

La quantité de micro-organismes présents dans chaque condition et échantillon a été évaluée en mesurant le nombre d'unités formant colonies par millilitre (UFC/mL). Cela impliquait de compter toutes les colonies de levures et de bactéries résistantes chloramphénicol sur chaque plaque et de déterminer le nombre d'UFC/mL pour chaque échantillon et chaque condition (Fig 3). De plus, les colonies ont été examinées visuellement et des isolats spécifiques ont été choisis en fonction de leur morphologie. On a pu ensuite déterminer s'il s'agit de bactéries ou de levures par examen microscopique.

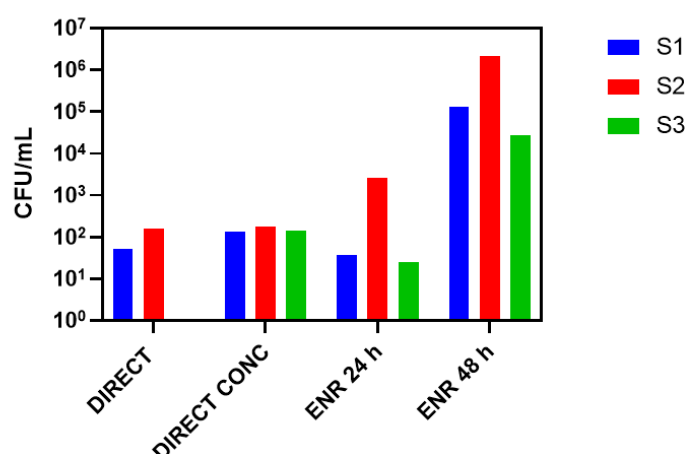


Fig 3. Nombre de Colony-Forming Unit (CFU) par mL des échantillons S1,S2,S3 ensemencés. Les nombre de CFU a été calculé en fonction de plusieurs méthodes : Directe , Directe Concentré, Enrichissement 24h et 48h

Tableau 1. Nombre d'isolat sélectionné par échantillon puis déterminé par microscopie optique

	Levures	Bactéries résistantes au chloramphénicol (100µg/µL)	Total
Echantillon 1 (S1)	7	0	7
Echantillon 2 (S2)	0	7	7
Echantillon 3 (S3)	5	2	7
Total	12	9	21

Echantillon 1 (S1)

Pour l'échantillon 1 (S1), différentes colonies (levures) ont été obtenues par le biais de plusieurs méthodes. (Direct, Direct concentré ou par enrichissement). Cependant, plusieurs colonies de levures furent obtenues sur gélose Directe, Directe concentré et Enrichissement 48h. Deux à trois colonies pour chaque morphologie ont été sélectionnées et après observation microscopique, il s'avère que ces colonies sélectionnées sont toutes de levures.

Echantillon 2 (S2)

Pour ce qui est de l'échantillon 2 (S2), il a été possible d'obtenir des colonies en fonction des méthodes utilisées. On ne remarque aucune présence de levures pour les conditions Directe, Directe Concentré ou pour l'Enrichissement de 24h et 48h. Au total, sept colonies ont été prélevées, on peut confirmer par microscopie qu'il s'agit de bactéries résistantes au chloramphénicol (CAM).

Echantillon 3 (S3)

Enfin avec l'échantillon 3 (S3), des isolats ont été obtenus dans toutes les conditions sauf pour les de la condition Directe où il y a une absence complète de colonies. Cependant, plusieurs isolats, à savoir sept colonies ont été sélectionnées par le biais des autres méthodes, après observation microscopique, on a pu distinguer 5 levures et 2 bactéries résistantes.

3.2 Identification des levures isolées

Les extraits d'ADN ont été obtenus à partir des 12 isolats de levure issue de cultures de *Nannochloropsis gaditana*. Pour déterminer les espèces ou genres de ces levures, nous avons amplifié les régions ITS et D1/D2. Le séquençage de nos séquences de levures ont été obtenues pour méthode Sanger en utilisant la compagnie StabVida. Après séquençage, nous avons utilisé les séquences des deux régions pour l'identification moléculaire par BLAST sur le site du NCBI. On se réfère alors sur le pourcentage d'Identity le plus proche de notre séquence (Tableau 2). Grâce à cela, nous avons pu identifier 4 espèces de levures différentes dans les échantillons de culture de *Nannochloropsis gaditana*.

Tableau 2. Identification des différentes levures isolées et obtenues dans les échantillons de culture de *Nannochloropsis gaditana*

Echantillon	ID	Espèce	Numéro d'ordre NCBI		Condition d'isolation
			Région D1/D2	Région ITS	
S1	IST805	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	PP944307	PP952017	Directe
	IST809	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	PP944301	PP952011	Directe Concentré

	IST812	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	PP944304	PP952014	Directe Concentré
	IST813	<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	PP944305	PP952015	Enrichissement 24h
	IST810	<i>Rhodotorula diobovata</i>	PP944302	PP952012	Directe
	IST811	<i>Rhodotorula diobovata</i>	PP944303	PP952013	Direct
	IST814	<i>Rhodotorula diobovata</i>	PP944306	PP952016	Enrichissement 24h
S3	IST806	<i>Rhodotorula diobovata</i>	PP944308	PP952018	Directe Concentré
	IST807	<i>Rhodotorula diobovata</i>	PP944309	PP952019	Enrichissement 48h
	IST808	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PP944310	PP952020	Enrichissement 48h
	IST827	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	PP944311	PP952021	Directe Concentré
	IST828	<i>Vishniacozyma carnescens</i>	PP944312	PP952022	Directe Concentré

3.3 Identification des bactéries résistantes isolées

Dans le cadre d'une expérimentation, l'ADN de 9 isolats de bactéries résistantes au chloramphénicol, prélevés des échantillons 2 et 3 de *Nannochloropsis gaditana*, a été extrait et la région 16S a été amplifiée. Après purification, les séquences obtenues ont été analysées par séquençage Sanger, grâce à la collaboration de nos partenaires de l'IGC. Ces séquences ont ensuite servi à l'identification moléculaire des espèces ou genres de bactéries (Tableau 3).

Tableau 3. Identification des différentes bactéries résistantes au chloramphénicol isolées et obtenues dans les échantillons de culture de *Nannochloropsis gaditana*

Echantillon	ID	Genre	% Identification Région 16S	Condition d'isolation
S2	ISTB41	<i>Pseudomonas sp</i>	99.63%	Enrichissement 48h
	ISTB42	<i>Pseudomonas putida</i>	99.38%	Enrichissement 48h
	ISTB43	<i>Pseudomonas marincola</i>	99.77%	Directe Concentré
S3	ISTB45	<i>Pseudomonas segetis</i>	100.00%	Directe
	ISTB46	<i>Pseudomonas sp</i>	98.94%	Directe

	ISTB47	<i>Pseudomonas maricola</i>	100.00%	Directe
	ISTB48	<i>Pseudomonas segetis</i>	98.84%	Directe
	ISTB50	<i>Pseudomonas segetis</i>	99.44%	Enrichissement 24h
	ISTB51	<i>Thalassospira sp</i>	100.00%	Enrichissement 24h

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont Gram négative et couramment trouvées dans le sol et les environnements marins (Park et al., 2006). Parmi elle, *Pseudomonas maricola*, qui est Gram négative, aérobie et souvent isolé à partir des environnements marins (Romanenko et al. 2008). Cette espèce est capable de se développer entre 5 et 37°C à un pH entre 5.5 et 9.5 (Romanenko et al. 2008). *Pseudomonas segetis*, qui est une espèce qui peut être isolé à partir de la terre. Cette espèce est reconnue pour améliorer la croissance de plantes, le développement de cette espèce se fait entre 4 et 35°C. *Pseudomonas putida*, fréquemment isolé dans l'eau, les plantes ou la terre, on la retrouve dans tous ces milieux, car c'est une espèce qui n'est pas difficile (Weimer et al. 2020). La bactérie *Thalassospira* est quant à elle une bactérie d'eau de mer, elle est Gram négative et se développe entre 10 et 140°C avec un pH entre 5-10 (Chunming et al., 2018).

3.4 Courbe de croissance

Pour ce qui est de la courbe de croissance, les levures (DO_{initial}=1) ont été cultivées dans un milieu minimum comme dis précédemment dans des températures favorisant leur croissance. Dans notre cas, 10 des 12 levures ont été incubées à 30°C sous agitation et 2 isolats (IST827, IST828) ont été cultivé à 22°C sous agitation (Fig4). En effet, on a pu remarquer par expérience que ces deux isolats ne se développe pas de façon optimale à 30°C, d'où l'intérêt de les mettre à 22°C. En effet, une mesure de la DO_{600nm} est mesurée deux fois tous jours pendant 3-4 jours afin d'établir une courbe. Cela nous permettre d'évaluer la croissance en fonction du temps des levures en fonction de l'isolat ou de l'espèce. Nous élaborons aussi la courbe de croissance des souches contrôles (IST657/IST536 MM15) pour la production de lipides afin de savoir à quel stade de croissance étaient les contrôles lors de la mesure de la production de lipides.

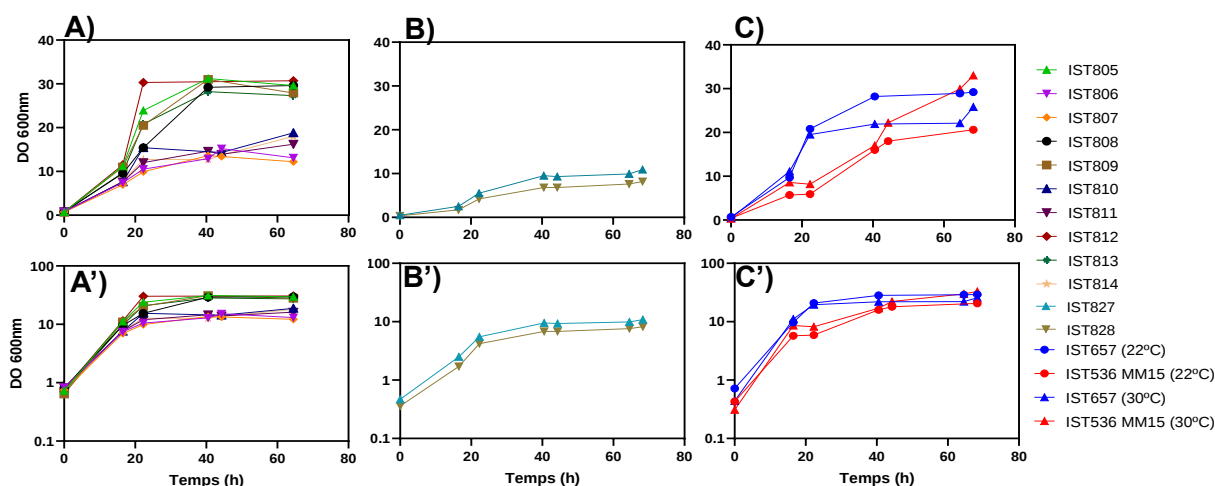


Fig 4. Courbe de croissance des isolats identifiés cultivé à 30°C et 22°C sous agitation
A-Souche isolées à 30°C, B-Souches isolées à 22°C, C-Souches de référence IST657/IST536 MM15. « ' » représentant les résultats en log10.

En observant les résultats des figures A ou A', on remarque deux populations qui se distinguent. La première population se composant des souches IST805, 809,812 IST813 issue de l'espèce *Rhodotorula sphaerocarpa*. Avec aussi la souche IST808 représentant l'espèce *Rhodotorula mucilaginosa*. En regardant la courbe de croissance de ces souches isolées, on remarque que la première population est un plus grand producteur final de biomasse que la deuxième population, à savoir IST806,814,811,810 et IST807 représentant seulement l'espèce *Rhodotorula diobovata*.

Pour ce qui est des figures B et B' représentant les souches IST827 et IST 828 de l'espèce *Vishniacozyma carnescentis*. On distingue que ces isolats sont des producteurs finaux de biomasse inférieurs aux populations de *Rhodotorula sphaerocarpa* et *Rhodotorula mucilaginosa* sur les graphiques A et A' malgré les conditions réunis pour une bonne croissance de cette espèce souche. Cependant, la comparaison entre ces deux graphiques n'est pas comparable étant donné que les conditions de culture ne sont pas les mêmes.

En comparant les résultats des cultures de contrôles à 30°C du graphique C et C' avec celle d graphique A et A', nous pouvons dire que les contrôles produisent tout autant de biomasse finale que la population la plus haute. Tandis que pour les contrôles à 22°C, on remarque que leur production de biomasse finale est plus haute que les souches ITS827/828. En comparant les mêmes souches contrôles à 30°C et 22°C, on distingue qu'une plus grande quantité pour les conditions 30°C que 22°C. Enfin, en comparant les différentes espèces des souches contrôles, on distingue une différence de paterne de croissance entre les deux espèces.

3.5 Résultat de la production de lipides

On va mettre en évidence la capacité des levures à produire et stocker les lipides dans un milieu minimum pour les souches se développant à 30°C et 22°C(Fig6) pendant 72h. On va alors mesurer la « Relative Fluorescence Unit » (RFU) grâce à un à un fluorochrome, le Nile Red. On utilise deux contrôles, à savoir un contrôle représentant une souche isolé d'une culture de microalgue dans les mêmes conditions dans ce laboratoire [*R. mucilaginosa* (IST657)]. L'autre contrôle IST536 MM15 (*Rhodotorula toruloides*) et qui a la capacité de produire une grande quantité de lipides (Fernandes et al. 2023).

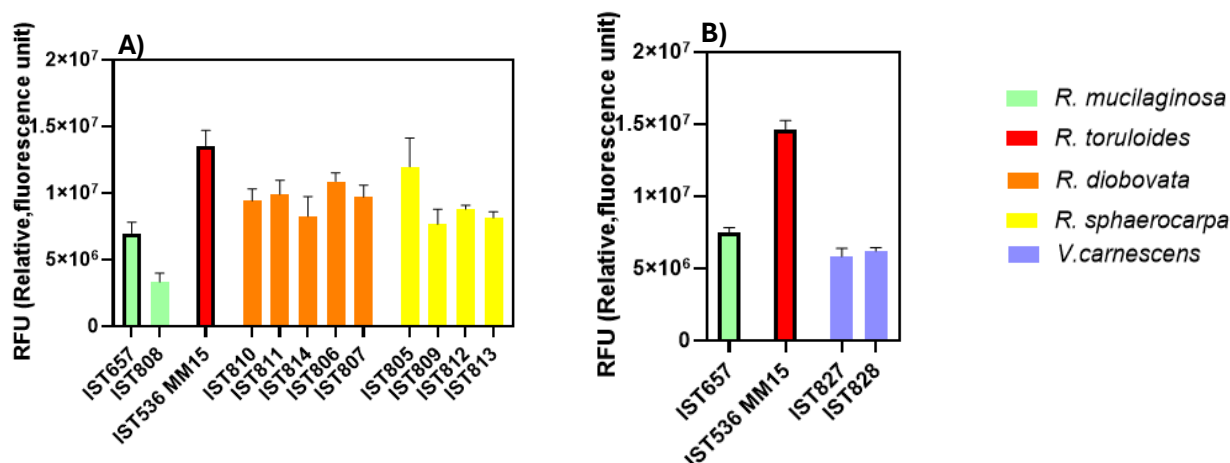


Fig 6. Production de lipides de différentes isolations obtenu par la méthode Nile Red A- représentant les levures cultivées à 30°C, B- étant les levures cultivées à 22°C. Les différents contrôles IST 536 MM15 et IST657 sont représentés par des bordures noirs. Fluorescence mesurée sans autofluorescence de PBS et normalisé par le nombre de cellules

Pour ce qui est des résultats, nous pouvons déjà dire que les contrôles sont en adéquation avec ce que l'on pensait. En effet, on remarque effectivement une production moyenne de lipides pour la souche IST536 et une forte production en lipides pour la souche IST536 MM15. Ensuite, On distingue qu'en général, les souches isolées produisent une grande quantité de lipides. À l'exception de la souche IST808 (*Rhodotorula mucilaginosa*), IST827 et IST828 (*Vishniacozyma carnescens*) ou l'on remarque qu'elles sont inférieures à la souche IST657. Enfin, on remarque que pour la souche isolée IST805 (*Rhodotorula sphaerocarpa*), on peut alors supposer que cette souche isolée est un grand producteur de lipides. Cependant on ne peut pas l'affirmer étant donné que l'écart-type montré pour cette souche est conséquent montrant une grande variabilité des valeurs relevées pour cette souche.

3.6 Résultat du métabolisme des sources de carbone

Pour mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines voies de métabolisme de différentes sources de carbone d'intérêt pour la circulaire bioéconomie. Les isolats ont été ensemencés sur différentes géloses contenant différentes sources de carbone. Nous utilisons comme contrôle positif pour le glycérol et le xylose les souches IST657 et IST 536 MM15. Pour ce qui est du méthanol, nous avons utilisé deux nouvelles souches contrôles positifs : IST592 et IST350 (*Candida boidinii*) ces souches sont connues pour justement l'utilisation de méthanol comme source de carbone, les résultats sont reportés sur le tableau 4.

Tableau 4. Métabolisme de différentes sources de carbones sur les différentes souches sélectionnées à 30°C ou 22°C Les souches de IST 805 à IST814 sont à 30°C tandis que les souches IST827/828 sont à 22°C. Les contrôles sont ensemencés dans les deux conditions.

	Glycérol 1,5% (v/v)	Xylose (20 g/L)	Méthanol 1,5% (v/v)
IST657	+	+	

IST536 MM15	+	+	
IST350			+
IST592			+
IST805	+	+	-
IST809	+	+	-
IST812	+	+	-
IST813	+	+	-
IST810	+	+	-
IST811	+	+	-
IST814	+	+	-
IST806	+	+	-
IST807	+	+	-
IST808	+	+	-
IST827	+	+	-
IST828	+	+	-

+ : présence de croissance
- : absence de croissance

On peut déjà remarquer une croissance des différents contrôles sur les sources de carbones spécifique à leur croissance ce qui était attendu. Ensuite, une absence de croissance en présence de méthanol comme source de carbone pour toutes souches cultivées prouvant alors que les levures n'ont pas le métabolisme adéquat pour pouvoir dégrader le méthanol comparé aux souches contrôles IST350 et IST 592 où un développement est observé sur la gélose. Cependant, toutes ont été positifs pour la croissance sur gélose de glycérol 1,5%(v/v) et xylose (20 g/L) démontrant alors la capacité des souches à métaboliser le glycérol et le xylose afin de s'en servir comme source d'énergie.

3.7 Résultat production de biosurfactant

Les résultats furent obtenus à partir d'une culture d'une semaine en utilisant le surnageant sur une goutte lipidique de 1 mL. Le diamètre d'émulsification de l'huile fût mesuré 2 après avoir déposé le surnageant (40 µL). Les contrôles sont du SDS à 1% (+) qui est un agent chélateur et du milieu de culture minimum (-) (Fig7).

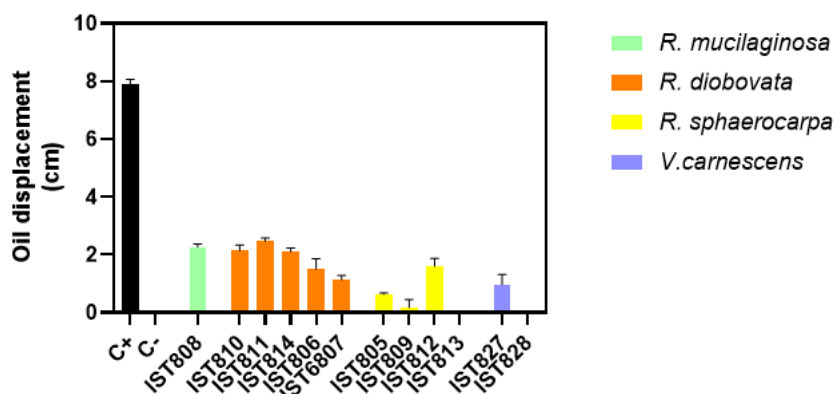


Fig 7. Evaluation du diamètre d'émulsification dans le « Oil displacement » test en fonction des souches isolées.

Pour ce qui est des contrôles, on remarque un grand diamètre formé après ajout de SDS (C+), tout le contraire de l'eau stérile (C-) ce qui était attendu. On remarque que le diamètre d'émulsification est nettement inférieur au contrôle positif démontrant pour toutes les souches isolées. On remarque même une absence d'émulsification pour certaines souches (IST 813, 828). D'un autre côté, on remarque quelques souches se démarquant, notamment les souches 810, 811 et 814 appartenant à l'espèce *Rhodotorula diobovata*, de même pour la souche 808 qui est *Rhodotorula mucilaginosa*.

4. Discussion

Parmi les échantillons reçus, 12 levures ont été isolées et quatre espèces ont pu être identifiées. Parmi ces quatre, dont trois espèces viennent du genre *Rhodotorula*. Ce genre est très représenté dans les levures marines (Loque et al., 2010a). De plus, *Rhodotorula* a la capacité de pouvoir synthétiser énormément de lipides et de l'accumuler au niveau intracellulaire (Mota et al., 2022) (Salvador López et al., 2022) ce qui est utile ensuite pour le monde de l'industriel ou de l'alimentation. Néanmoins, la grande productivité des lipides est très dépendante des conditions de cultures. Dans notre cas, les résultats obtenus collaborent avec l'idée permettant d'affirmer que les espèces du genre *Rhodotorula* serait efficace pour la production de lipides. En effet, il est reporté comme quoi *Rhodotorula sphaerocarpa* est une espèce produisant plus de lipides que d'autres espèces, ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus pour la souche 805, il est dit dans une publication (Salvador López et al., 2022) que cette espèce contient entre 25,95-43%% de lipides ce qui est conséquent. Pour un résultat qui n'était pas attendu venant d'une espèce « oléagineux », la souche *Rhodotorula mucilaginosa* (805) qui aux vues des résultats obtenus par méthode Nile Red, est considéré comme un producteur bas de lipides avec les chiffres des publications trouvées (Salvador López et al., 2022) allant de 20,24% à 32,74% de lipides produits. Cette incohérence pourrait venir de la souche qui est issue à la base d'une seule qui elle-même ne devait pas produire énormément de lipides. Cela peut aussi venir de la méthode utilisée qui n'est pas totalement fiable. Enfin pour l'espèce de *Rhodotorula diobovata*, il est dit dans la publication Salvador López et al., 2022 que cette espèce peut être composée entre 21% et 40% de lipides ce qui corrèle avec les résultats obtenus. Pour ce qui est de l'espèce *Vishniacozyma carnescens*, aucune publication étudiant la capacité de cette espèce à être une bonne source de production de lipides, nous ne pouvons pas alors comparer les résultats ce qui rend difficile l'interprétation.

Pour ce qui est de la capacité à métaboliser certaines sources de carbones par les levures, les publications nous montre l'utilisation de glycérol comme source de carbone (Mota et al. 2022) .Notamment *Rhodotorula mucilaginosa* est capable de produire beaucoup de caroténoïdes à partir de cette source de carbone (Li et al. 2022). Pour ce qui est des autres espèces isolées, les publications scientifiques ne mentionnent pas les autres espèces *Rhodotorula* ou *Vishniacozyma carnescens* isolées dans ce cas-ci utilisant le glycérol comme source de carbone. On se réfère alors à nos résultats qui montrent que toutes les espèces isolées consomme le glycérol pour s'en servir comme source de carbone. En se basant alors sur les résultats obtenus, on remarque que toutes les souches isolées consomment le xylose ce qui était attendu étant donné la plupart des levures non conventionnelle utilise le sucre en tant que source de carbone ((Estrada-Ávila et al. 2022). Le cas de dégradation du méthanol est rare et seulement un nombre d'espèces restreint arrive à dégrader le méthanol comme *C. boidinii*

(Hartner and Glieder 200) qui est une levure capable de dégrader le méthanol et qui justement de contrôle (IST 350/592). De ce fait, les résultats obtenus étaient attendus du fait du cercle fermé des levures utilisant le méthanol comme source de carbone.

Enfin, Les biosurfactants constituent un vaste ensemble de composés variés synthétisés par divers micro-organismes, ils se distinguent par leur faible toxicité, leur grande biodégradabilité et leur compatibilité environnementale, ce qui les rend adaptés à une large gamme d'applications industrielles (Kumar et al. 2021). Ces caractéristiques permettent aux biosurfactants de réduire la tension superficielle et d'améliorer l'interface entre deux liquides non miscibles, augmentant ainsi la solubilité des composés hydrophobes dans les milieux aqueux et facilitant la formation d'émulsions. *R. taiwanensis* (Lyman et al. 2018) est décrit comme étant une espèce produisant énormément de biosurfactant, une espèce qui n'a pas été isolée. Cependant, nous avons isolé cinq souches *Rhodotorula diobovata*, appartenant au genre *Rhodotorula* incluant plusieurs espèces qui produisent des biosurfactants (Lyman et al. 2019). En se référant alors aux résultats obtenus et aux résultats publiés, en général, les souches issues du genre *Rhodotorula* produisent des biosurfactants.

Les méthodes utilisées pour déterminer ici nous ont permis de déterminer différentes propriétés issues des colonies préalablement isolées. Cependant, il existe des limites à certaines méthodes pouvant biaiser les résultats. Comme les conditions de culture en laboratoire peuvent ne pas refléter les conditions optimales, ce qui peut limiter la croissance de certaines espèces ou la production de certains composés.

Le fait aussi que l'on ne sélectionne que certaines colonies isolées en fonction de la morphologie, de ce fait certaines espèces sont identiques au niveau morphologique ce qui rend donc la sélection de toutes les espèces contenues dans l'échantillon difficile.

Pour ce qui est de la détermination de la production de lipides par fluorescence, cette méthode est semi-quantitative. En effet, elle ne permet de déterminer que si une souche produit beaucoup de lipides, on ne peut pas quantifier avec cette méthode, on ne sait pas aussi quel type de lipides ces espèces produisent. De plus le fluorochrome utilisé ici a une demi-vie courte pouvant influencer sur les résultats. Il faut aussi mettre en avant que cette méthode inclue tous les lipides issus des levures, incluant leur membrane ou d'autres organites. En sachant cela, plusieurs paramètres peuvent rentrer en compte comme l'espèce, leur croissance qui diffère en fonction de l'espèce.

Enfin pour l'étude des propriétés de biosurfactant, nous nous sommes servis de protocole issu de la publication de Petra de Oliveira Barros et al., 2024. Les résultats obtenus dépendent du temps de culture de la colonie entraînant des conséquences sur la concentration en biosurfactant. Ensuite, c'est une méthode relative ne mettant en avant que la capacité à produire des biosurfactants mais l'on ne sait pas la quantité ou ni le type de biosurfactants. De plus les conditions de culture qui peuvent influencer sur la capacité à produire des levures.

En prenant compte des différentes limites des méthodes, l'amélioration de certaines méthodes ou une augmentation du nombre de réplica aurait pu être possible, mais faute de temps cela n'a pas été possible.

5. Conclusion

Les informations acquises lors de cette étude a permis de comprendre la démarche prise afin d'identifier l'espèce et les propriétés des levures contenues dans des milieux biologiques marins.

Nous avons pu isoler dans nos trois échantillons un maximum de 12 souches levures marines appartenant à 4 espèces différentes par le biais de plusieurs méthodes d'isolation. Les appareils de biologies moléculaires ont été ensuite utilisés afin d'extraire, purifier et séquencer l'ADN afin de pouvoir déterminer les différentes espèces contenues dans les échantillons. Les propriétés des différents isolats ont été ensuite mis en évidence, à savoir leur capacité de croissance, la faculté à production des lipides, leur métabolisme sur différentes sources de carbones et leur capacité à produire des biosurfactant. Les résultats ont été ensuite comparés à la bibliographie, mais manques de résultats publiés, des propriétés n'ont pas être comparés ce qui nécessiterait une étude plus approfondie.

Nous avons pu aussi isoler et identifier 9 souches de bactéries résistantes au chloramphénicol appartenant à deux genres différents dans nos trois échantillons.

D'un point de vue personnel, réaliser ce stage de plusieurs mois a été très enrichissant étant donné que cela m'a permis de me sentir intégrer au sein d'un projet, connaître le travail en équipe, mais aussi faire part d'autonomie à certains moments. Cela m'a permis de développer un sens d'analyse des résultats obtenus afin de pouvoir en tirer des conclusions.

6. Bibliographie

- Abdelfattah A, Ali SS, Ramadan H, et al (2023) Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects. *Environmental Science and Ecotechnology* 13:1–18
- Estrada-Ávila AK, González-Hernández JC, Calahorra M, et al (2022) Xylose and yeasts: A story beyond xylitol production. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1866:1-13
- Fernandes MA, Mota MN, Faria NT, Sá-Correia I (2023) An Evolved Strain of the Oleaginous Yeast *Rhodotorula toruloides*, Multi-Tolerant to the Major Inhibitors Present in Lignocellulosic Hydrolysates, Exhibits an Altered Cell Envelope. *Journal of Fungi* 9:1-16
- Frengova GI, Beshkova DM (2009) Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:163–180
- Gaurav K, Neeti K, Singh R (2024) Microalgae-based biodiesel production and its challenges and future opportunities: A review. *Green Technologies and Sustainability* 2:1–19.
- Hartner FS, Glieder A (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* 5 :1-21
- Jung S, Satoh S, Daitoku H, et al (2022) Green diastereospecific synthesis of various medicine analogues containing dipeptides and release of the medicines by Baker's yeast. *Tetrahedron* :1-12
- Kumar A, Singh SK, Kant C, et al (2021) Microbial biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants* 10 :1-26
- Li Z, Li C, Cheng P, Yu G (2022) *Rhodotorula mucilaginosa*—alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon* 8:1–18
- Loque CP, Medeiros AO, Pellizzari FM, et al (2010a) Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. *Polar Biol* 33:641–648.
- Lyman M, Rubinfeld B, Leif R, et al (2018) *Rhodotorula taiwanensis* MD1149 produces hypoacetylated PEFA compounds with increased surface activity compared to *Rhodotorula babjevae* MD1169. *PLoS One* 13:1–17.
- Lyman M, Urbin S, Strout C, Rubinfeld B (2019) The Oleaginous Red Yeast *Rhodotorula/Rhodospiridium* : A Factory for Industrial Bioproducts . In: *Yeasts in Biotechnology*. IntechOpen :1-17

- Martins LC, Palma M, Angelov A, et al (2021) Complete utilization of the major carbon sources present in sugar beet pulp hydrolysates by the oleaginous red yeasts *Rhodotorula toruloides* and *R. mucilaginosa*. *Journal of Fungi* 7:1-21
- Mota MN, Múgica P, Sá-Correia I (2022) Exploring Yeast Diversity to Produce Lipid-Based Biofuels from Agro-Forestry and Industrial Organic Residues. *Journal of Fungi* 8 :1-46
- Nakata S, Hio M, Takase R, et al (2020) Polyunsaturated fatty acids-enriched lipid from reduced sugar alcohol mannitol by marine yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis* Y2. *Biochem Biophys Res Commun* 526:1138–1142
- Onyeaka H, Miri T, Obileke KC, et al (2021) Minimizing carbon footprint via microalgae as a biological capture. *Carbon Capture Science and Technology* 1 :1-14
- Palma M, Mondo S, Pereira M, et al (2022) Genome Sequence and Analysis of the Flavinogenic Yeast *Candida membranifaciens* IST 626. *Journal of Fungi* 8:1–21.
- Pereira L (2021) Macroalgae. *Encyclopedia* 1:177–188.
- Petra de Oliveira Barros V, Macedo Silva JR, Maciel Melo VM, et al (2024) Biosurfactants production by marine yeasts isolated from zoanthids and characterization of an emulsifier produced by *Yarrowia lipolytica* LMS 24B. *Chemosphere* 355:1-14
- Romanenko LA, Uchino M, Tebo BM, et al (2008) *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:706–710
- Salvador López JM, Vandeputte M, Van Bogaert INA (2022) Oleaginous yeasts: Time to rethink the definition? *Yeast* 39:553–606
- Staniszewski A, Kordowska-Wiater M (2021) Probiotic and potentially probiotic yeasts—characteristics and food application. *Foods* 10:2-13
- Tan J Sen, Lee SY, Chew KW, et al (2020) A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered* 11:116–129
- Tullio V (2022) Yeast Genomics and Its Applications in Biotechnological Processes: What Is Our Present and Near Future? *Journal of Fungi* 8 :1-16
- Weimer A, Kohlstedt M, Volke DC, et al (2020) Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:7745–7766
- Xia D, Qiu W, Wang X, Liu J (2021) Recent advancements and future perspectives of microalgae-derived pharmaceuticals. *Mar Drugs* 19:1–23
- Zaky AS, Tucker GA, Daw ZY, Du C (2014) Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Res* 14:813–825

Annexe 1 : Container



Green Wall



Photobioréacteur

Annexe 2 : Protocole de purification des séquences avec colonne Nzytech

1. Excise the DNA fragment from the gel with a clean, sharp scalpel. Weight the gel slice and transfer to a 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. Add 300 μL of Binding Buffer for each 100 mg of gel weight (example – a gel slice weighing 125 mg would require 375 μL of Binding Buffer). For high concentration gels (2.0-3.0%), 500 μL of Binding Buffer per 100 mg of agarose gel should be added. The maximum amount of gel slice per NZYtech spin column is 400 mg. For gel slices >400 mg use more than one column.
3. Incubate at 55-60 $^{\circ}\text{C}$ for 5-10 minutes and shake occasionally until agarose is completely dissolved.
4. Check that the colour of the mixture is yellow (similar to the colour of the Binding Buffer). If the colour of the mixture is orange or violet, add 10 μL of 3 M sodium acetate pH 5.0, and mix well.
5. (Optional) For DNA fragments 10 kb long, add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix well by pipetting several times (example – a gel slice weighing 125 mg would require 125 μL of isopropanol).
6. Load the above mixture into the NZYtech spin column placed into a Collection tube (2 mL). Centrifuge for 30 s to 1 minute and discard the flow-through in the collection tube. The maximum volume of the column reservoir is 700 μL . For sample volumes of more than 700 μL , simply load and spin again.

7. (Optional) Add 500 µL of Wash Buffer and centrifuge for 30s to 1 minute. Discard the flow-through in the collection tube. This step is only important if DNA is intended to be used for direct sequencing, in vitro transcription or microinjection.
8. Add 600 µL of Wash Buffer and centrifuge for 30s to 1 minute. Discard the flow-through in the collection tube.
9. Centrifuge for 1 minute to dry NZYtech spin membrane of residual ethanol.
10. Place the NZYtech spin column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 50 µL of Elution Buffer to the centre of the column and incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge for 1 minute to elute DNA. Ultrapure water (pH 7.5-8.5) may be used in place of elution buffer. However, DNA recovery with acidic waters may be significantly reduced.
11. Store the purified DNA at -20 °C.