

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master académique

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Biotechnologie**

Spécialité : **Biotechnologie microbienne**

Présenté par :

- Boumaaza Fatima Zohra
- Bouteldja Kheira
- Guessab marwa

Thème

**Evaluation de l'Effet Antioxydant des Produits Bioactifs
Obtenus des Microalgues des Eaux Douces.**

Soutenu le 29/06/2020, devant le jury composé de :

Président	: Dr. Yezli Wassim	M.C.A	Université de Tiaret
Examinatrice	: Dr. Mezouer Djamila	M.C.B	Université de Tiaret
Encadreur	: Dr. Ali-Nehari Abdelkader	M.C.A	Université de Tiaret

Année Universitaire 2019-2020

Dédicaces

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail à Mes très chers parents, «*Abdelkader et Kheira* » qui ont consacré leurs vies pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. Je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

A ma très chère mère

En particulier je dédie ce modeste travail à celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs quoi que je fasse ou quoi que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit ta prière et ta présence à mes côtés ont toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher papa

Je dédie ce modeste travail aussi à mon support dans ma vie qui m'a soutenu, dirigé, encouragé, motivé et qui a toujours sacrifié pour me voir réussir à toi mon père Merci maman, merci papa que dieu vous protège, pour nous.

A mes chers frères *Mohamed et Nadjib*.

A ma famille, qui ma dotée d'une éducation digne son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui en particulier ma grande mère «*Khalidia* » qui m'a toujours encouragé.

A mes tantes, et mes oncles et à toute la famille *Boumaaza et Chehda*.

A mes cousins et cousines et surtout «*Chehda mohamed redouane* » pour son aide dans mes études durant toute ma carrière.

A mes chères amies qui ont été toujours autour de moi «*Afrak, Fouzia, Fatima Naamani, Nina Chehbi, kheira et samia* »

A mon binôme *kheira*. Et mon trinôme *marwa*.

A ceux qui n'ont jamais cessés de m'encouragé et de me conseiller et qui ont toujours été là pour moi.

B Fatima Zohra

Dédicaces

Mes remerciements vont tout d'abord au **ALLAH** pour la volonté et la patience qu'il m'a donné durant ces longues années d'étude afin que je puisse arriver à ce stade là

Je tiens à remercier vivement notre encadreur **Dr.ALI NEHARI Aek** qui nous a fait honneur de nous diriger et guider au cour de la réalisation de ce travail.

J'adresse toute mon affection à ma famille et en particulier du fond de mon cœur, je dédie ce présent travail :

A celle qui a sacrifié pour mon éducation, qui est ma source de tendresse de don et de confiance qui attend ma réussite ma chère mère **Fatima** qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance avec mes vœux de bonne santé et de longue vie et a mon roi mon trésor précieux et ma source d'inspiration , de courage et de patience mon père **djilali** qui ma inséré le goût de la vie et le sens de responsabilité .. merci mes chers parents merci pour votre aide, merci pour votre présence et tes encouragements qui sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Que **ALLAH** vous accorde une longue vie papa,maman...

J'adresse ma plus profonde gratitude a mes princesses, mes chéressoeurs : **mouna , nawel, chahrazed, mokhtaria, dounia, chaïmaa** qui ont toujours été là pour moi et pour leurs encouragements et Leur grande aide ce présent travail a pu voir le jour grâce à leur soutien inconditionnel ..

Et a toute ma famille **Bouteldja** et **benzineb**

Je tiens a remercier tous mes amies pour leurs soutiens particulièrement et surtout :**torkia malek ,maria nor el houda , mbarka nina , fatima naamani , fatima boukhalwa , wafaa ismahen**

Et a mon bînomme : **fatima zohra**

Et a mon trînomme : **marwa**

Et que notre amitié dure pour toujours...

B Kheira

Dédicaces

Je dédié ce travail

A DIEU tout puissant D'avoir été toujours là pour moi, surtout dans les Moments difficiles et de m'avoir donné la conviction que je puisse arriver au terme de ce travail. Je remercie dieu pour ce que j'ai et ce que je suis.

Je dédiée ce travail :

A Mon adorable mère pour son soutien et ses encouragements, Merci maman.

A mon cher père, que Dieu vous fasse miséricorde, merci pour votre confiance et votre patience sont mes bien les plus précieux.

Mes frères (Abed Riad et Youssef) et mes sœurs Pour leur affection.

Que dieu leur accorde le succès, le bonheur et la santé et renforce notre union familiale.

A mon cher mari Abdel Basset, Ma source d'espoir et de bonheur, que dieu te protège. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond amour et ma grande reconnaissance au dieu.

A mon trînômes fazo et kika mes amis et camarades de promotion Pour son encouragement A tous ceux que j'aime merci.

G, marwa

Remerciements

Tout d'abord Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné de la santé, la volonté, la force et de la patience pour réaliser ce travail.

Au terme de ce modeste travail, qui a été limité vu le confinement qui a été exigé à cause du « covid 19 »

Nous tenons à remercier infiniment et avec gratitude notre encadreur « Dr. Ali-Nehari Abdelkader » pour sa confiance, sa patience, son entière disponibilité, ses conseils, ses orientations, ses encouragements incessants et de tous les efforts qu'il a fourni pour mener à bien ce mémoire,» pour la qualité de son encadrement, ses compétences scientifiques qui nous 'a permis d'élargir nos connaissances et s'enrichir d'avantage, pour sa gentillesse et pour sa collaboration.

Nos remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu accepter de juger notre travail; Dr. Yezli Wassim et Dr. Mezouer Djamila.

Nous tenons également à remercier tous les étudiants de notre promotion (2019-2020)

Un grand merci à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et particulièrement nos enseignants de spécialité, Biotechnologie microbienne.

Nos remerciements vont également à tous les techniciens des laboratoires pédagogiques de L'université Ibn khaldoun Tiaret pour leur aide durant toute la période de nos études

Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

ملخص

في الوقت الحالي، إلى جانب الدور المهم الذي تلعبه الطحالب الدقيقة في اكتشاف منتجات جديدة نشطة حيويًا ، فإنها جذبت الكثير من الاهتمام كونها مصدر محتمل لإنتاج مضادات الأكسدة الطبيعية لتحل محل المنتجات الاصطناعية. تهدف هذه الدراسة إلى جمع الطحالب الدقيقة من المياه العذبة من سد بخدة الواقع في ولاية تيارت ، لاستخدامها كمورد لعزل واستخلاص المركبات البيولوجية النشطة من أجل تقييم قدرتها المضادة للأكسدة. للقيام بذلك، تم تجفيف كميات الطحالب الدقيقة التي تم جمعها حتى تصبح مادة جافة قبل عملية الاستخلاص. تم تنفيذ طريقتين مختلفتين (ديكوتيون ونقع) لاستخراج المركبات البيولوجية النشطة وذلك باستخدام خمسة مذيبات من أقطاب مختلفة: الماء ، الماء / الميثانول (20:80 ؛ ح / ح) ، الماء / الأسيتون (10:90 ؛ ح / ح) والكلوروفورم. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المختلفة من الطحالب الدقيقة باستخدام اختبار الجذر (DPPH) . أظهرت النتائج أن خليط الطحالب الدقيقة الذي تم جمعه يضم مجموعة متنوعة من الجزيئات الطبيعية المضادة للأكسدة التي لها تم تأكيد خصائصها المضادة للأكسدة من خلال تحديد عامل الارتباط الذي يشير إلى مساهمتها القوية بواسطة خاصيتها المضادة للجذور من خلال اصطياد الجذر الحر للمادة المستعملة في الاختبار (DPPH) .

كلمات دالة: الطحالب الدقيقة ؛ المركبات النشطة بيولوجيا ؛ النشاط المضاد للأكسدة؛
المحاليل العضوية؛ DPPH؛ سد بخدة.

RESUME

Actuellement, bien que les microalgues occupent une place importante dans la découverte de nouveaux produits bioactifs, ils ont attiré beaucoup d'attention en tant que source potentielle d'antioxydants naturels pour remplacer celles de synthèse. L'objectif de cette étude consiste à récolter les microalgues d'eaux douces du barrage Bakhadda situé à la Wilaya de Tiaret, afin de les utiliser comme ressource pour isoler et récupérer des composés bioactifs dans le but d'évaluer leurs pouvoir antioxydant. Pour ce faire, les quantités de microalgues récoltées, ont été lyophilisées en matière sèche avant de procéder à l'extraction. Deux méthodes différentes ont été réalisées (décoction et macération) pour extraire les composés bioactifs en utilisant cinq solvants de polarités différentes: eau, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme. L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits issus de microalgues a été effectuée à travers le test du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH). Les résultats ont montré que le mélange microalgale récolté montre une variété de molécules antioxydant naturelles possédant de propriétés antioxydantes, confirmé par la détermination du facteur de corrélation indiquant une forte contribution de ces composés par un pouvoir antiradicalaire à travers le piégeage du radical libre DPPH.

Mots clé : Microalgues ; composés bioactifs ; pouvoir antioxydant ; solvants organiques ; DPPH ; barrage Bakhadda.

Abstract

Currently, although microalgae play an important role in the discovery of new bioactive products, they have attracted a lot of attention as a potential source of natural antioxidants to replace synthetic ones. The objective of this study is to harvest freshwater microalgae from the Bakhadda dam, located in the Wilaya of Tiaret, in order to use them as a resource to isolate and recover the bioactive compounds in order to assess their antioxidant power. To do this, the quantities of microalgae harvested were freeze-dried into dry matter before extracting. Two different methods have been carried out (decoction and maceration) to extract the bioactive compounds using five solvents of different polarities: water, water / methanol (20:80; v / v), water / acetone (10:90; v / v) and chloroform. The antioxidant activity of the different extracts from microalgae was evaluated using the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical test. The results showed that the microalgal mixture collected has showed a variety of natural antioxidant molecules having antioxidant properties, confirmed by the determination of the correlation factor indicating a strong contribution of these compounds by an anti-radical power through the trapping of the free radical DPPH.

Keywords: Microalgae; bioactive compounds; antioxidant power; organic solvents; DPPH; Bakhadda dam.

Tables des Matières

Tables des matières.....	ix
Liste des Abréviations.....	xi
Liste des Tableaux.....	xii
Liste des Figures.....	xii
Résumés.....	v

1^{ère} partie : Introduction Générale

Introduction	1
--------------------	---

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes.....	5
I. 1. Matériels et produits	5
I. 2. Zone de travail	5
I. 3. Échantillonnage	7
I. 3.1. Prélèvement.....	7
I. 3.2. Conservation et transport.....	7
I. 3.3. Identification des microalgues.....	9
I. 3.4. préparation des échantillons.....	9
I. 3.4. 1. Filtration du milieu de culture.....	10
I. 3.4. 2. Centrifugation.....	10
I. 3.4. 3. Lyophilisation.....	10
I. 4. Extraction des composés bioactifs.....	12
I.4.1. Calcul des rendements en extraits.....	12
I. 4.2. Calcul de l'Indice de polarité.....	13
I. 5. Evaluation des activités antioxydantes.....	13
I. 5.1. Piégeage du radical libre	13
I.6. Analyses statistiques.....	15

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II. Résultats et Discussions	16
II. 1. Identification de microalgues récoltées	16
II. 1. 1. Observation microscopique	18
II. 2. Extraction des composés bioactifs	18
II. 2.1. Calcul des rendements en extraits	18
II. 2.2. Calcul de l'Indice de polarité	19
II. 3. Évaluation des activités antioxydantes	20
II. 3.1. Piégeage du radical libre DPPH	20
II. 3.2. . Evaluation de l'IC 50	21
II. 3.3. Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire	21
Conclusion	23
Références bibliographiques	24
Annexes	29

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
DPPH	: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
FRAP	: Ferric reduction antioxydant power
ORAC	: Oxygen Radical Absorbance Capacity
TRAP	Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter
ABTS	sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline -6- sulfonique
MS	: Matière sèche
IC50	: La concentration d'extrait à 50 % d'inhibition
BCB	: Blanchiment du β -carotène
Pi	: Indice de polarité
Øa	: Fraction volumique du solvant 1.
Øb	: Fraction volumique du solvant 2
Pa	: Indices de polarité du solvant 1
Pb	: Indices de polarité du solvant 2
DPPH (%)	: Pourcentage de réduction du DPPH.
DO contrôle	: Densité optique du tube contrôle négatif
DO échantillon	: Densité optique de l'échantillon
pH	: Potentiel d'hydrogène
T	: Température

Liste des tableaux

Tableau 1	Matériel et produits utilisés dans les différents dosages et analys	P.06
Tableau 2	Résumé des groupements majeurs des algues selon Mitchell, 1974	P.10
Tableau 3	Rendement des extraits de microalgues	P.11
Tableau 4	Valeurs d'Indice de polarité des solvants utilisés pour l'extraction	P.17

Liste des figures

Fig. 1	Photographie de l'emplacement de la Wilaya de TIARET et du barrage de Bakhadda	P.06
Fig. 2	Photo du barrage de Bakhadda - TIARET	P.06
Fig. 3	Photographies de quelques microalgues eucaryotes	P.08
Fig. 4	Photographie des microalgues (Bloom) poussant au barrage de Bakhadda	P.08
Fig. 5	Lyophilisation des microalgues	P.11
Fig. 6	Matière sèche après lyophilisation	P.11
Fig. 7	Extraction des composés bioactifs	P.14
Fig. 8	Schéma d'une structure de micro-algue unicellulaire	P.16
Fig. 9	Observation microscopique des souches de microalgues	P.18

Introduction Générale

Introduction générale

L'eau représente 70% de la superficie du globe terrestre dont 97 % est salée et ne convient pas à l'irrigation. L'eau douce, avec seulement 3% de cette eau totale, est une source indispensable à toutes formes de vie et à tous les écosystèmes. Dans ce faible pourcentage, les rivières et les lacs représentent 0,3%, alors que tout le reste est stocké dans les calottes polaires glacières et les nappes phréatiques (Hernández, 2006). La répartition des ressources en eau douce dans le monde est très inégale. Les régions du monde les plus pauvres en eau douce sont le Proche-Orient et l'Afrique dont L'Algérie, qui est constitué de zones arides et semi-arides. La zone humide est un écosystème formé par l'ensemble des biocénoses et de biotopes. La biocénose est l'ensemble des êtres vivant coexistant dans un espace définie comme les phytoplanctons qui constituée la majorité des micros algues (Abadli et Harkati, 2015).

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques unicellulaires dotées d'une croissance rapide et de la particularité de produire des métabolites industriellement intéressants (polysaccharides, pigments, lipides). On utilise le terme «micro» car la taille d'une microalgue varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Pour les étudier, il est nécessaire de les observer au microscope optique ou au microscope électronique, ce qui permet de voir plus de détails, en particulier relatifs à leur morphologie. Elles constituent un matériel photosynthétique de choix pour capturer du CO₂ et fabriquer de la biomasse (Abadli et Harkati, 2015). Les microalgues peuvent vivre sous forme libre ou en colonie. Ce sont des microorganismes appartenant à deux groupes: les eucaryotes et les procaryotes (Hammouda, 2013).

Les microalgues appartiennent aux différentes familles qui ont chacune leurs propres caractéristiques, mais elles ont aussi des points communs en particulier dans leur ultra structure et leur métabolisme. Les organismes photosynthétiques sont regroupés en trois catégories distinctes: les bactéries photosynthétiques, les algues et les plantes terrestres. Le terme algue regroupe des individus chlorophylliens vivant essentiellement dans l'eau et qui ne sont pas des embryophytes (Hammouda, 2013). Les contraintes du milieu aquatique ont conduit à des convergences structurales et physiologiques comme l'existence d'une paroi souple. Les organismes ainsi regroupés sont pourtant bien éloignés phylogénétiquement: comme les Rhodobiontes (algue rouge), Chlorobiontes, Straménopiles (algue brune), Haptophytes. Algues rouges et algues brunes sont des groupes monophylétiques c'est-à-dire se reconnaissent comme partenaires sexuels et donnent une descendance féconde. Par contre les algues vertes sont

paraphylétiques et donc des groupes dont l'ancêtre commun sont aussi partagés avec d'autres groupes (Habchi et Hidja , 2013).

Il existe plusieurs espèces de microalgues possédant un métabolisme hétérotrophe. Celle-ci se distingue toutefois de par leurs caractéristiques nutritionnelles et leur capacité à produire des acides gras pouvant servir à la production de biodiesel (ErellOlivo, 2007).

La composition biochimique des micro-algues présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, en protéines, en vitamines, en pigments et en antioxydants. Elles représentent une source importante de quasi toutes les vitamines essentielles : B1, B6, B12, C, E, K1, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle (0,5 à 1% de la matière sèche) qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2% de la matière sèche) et phycobiliprotéines (phycocérythrine et phycocyanine) (Habchi et Hidja , 2013). Ainsi, ils peuvent accumuler plus de 50% de leur poids sec en lipides. Ces derniers sont principalement constitués de triglycérides, de phospholipides, et de glycolipides. Ces lipides contiennent des acides gras saturés et polyinsaturés (AGPI) comme les oméga-3 : ALA, EPA, DHA, ou les oméga-6 : ARA (Dejoye Tanzi ; 2013)

Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de micro-algues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture). Certaines espèces présentent aussi une richesse en oligosaccharides et polysaccharides, d'autres encore peuvent produire des molécules à activité antivirales, antibiotiques, ou antiprolifératrices chez l'homme. Beaucoup de molécules restent probablement encore à découvrir et font l'objet de recherches dans beaucoup de laboratoires à travers le monde (Person, 2010).

Les premières utilisations des micro-algues datent de 2000 ans en Chine, *Nostoc*, une Cyanobactérie, avait été utilisée comme nourriture afin de survivre à une famine (Spolaore et al., 2006). Toujours dans un contexte de pénurie alimentaire, en 1940, les chercheurs se sont intéressés aux micro-algues comme aliments pour leurs teneurs en protéines. En France, l'activité commence à la fin des années 1970 avec l'apparition des premières écloséries de mollusques et la production de micro-algues pour l'aquaculture. En 2005, la production mondiale toutes espèces confondues est estimée à 7000 tonnes de matière sèche par an.

Aujourd'hui avec seulement quelques dizaines d'espèces cultivées, la production mondiale n'excède pas 10000 tonnes (Julie Person et al., 2011). Actuellement, les applications commerciales des micro-algues sont en plein essor. La diversité des espèces et la richesse en métabolites permet un large panel d'applications impliquant ainsi de nombreux secteurs industriels.

Aussi, et parmi les applications environnementales possibles ; les micro-algues sont capables d'assimiler de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, elles peuvent donc éliminer certains éléments présents dans les eaux usées. Elles permettent ainsi de baisser les taux de phosphates et nitrates. Elles ont une action détoxifiante et dépolluante et peuvent agir selon deux modes : soit directement grâce à leur capacité à fixer les métaux lourds, soit indirectement afin de fournir de l'oxygène dissous aux bactéries permettant la dépollution des eaux contaminées. Des travaux ont déjà été menés sur l'élimination des métaux lourds présents dans les eaux usées (Perales-Vela et al., 2006) et sur la dégradation de contaminants toxiques comme le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris* (Luan et al., 2006).

L'utilisation des microalgues à fins d'évaluer les effets bioactifs est loin d'être un phénomène nouveau. Si les principes actifs extraits des microalgues utilisés en biotechnologie sont peu nombreux, les travaux scientifiques en cours sont importants. Des milliers de molécules ont ainsi été identifiées. Ce sont des polysaccharides, des lipides ou encore de petits métabolites de nature phénolique (Deslandes et al., 2000) ou terpénique (Fleury et al., 1994; Ravi et al., 1982). Les activités décrites et associées aux microalgues sont très diverses: antimicrobiennes (Reichelt et al., 1984; Etahiri et al., 2007) anti-malariales (Wright et al., 1997) antioxydantes (Etahiri et al., 2001 ; Zubia et al., 2007), anti-inflammatoires (Etahiri et al., 2004), cytotoxiques (Ktari et Guyot, 1999), antivirales (Cacamesse et al., 1980) ainsi que d'autres activités. Actuellement, bien que les microalgues ont attiré beaucoup d'attention en tant que source potentielle d'antioxydants naturels pour remplacer celles de synthèse, tels que les pigments, les composés phénoliques et les vitamines, la majorité des recherches menées au cours des deux dernières décennies ont été principalement axées sur la production et l'accumulation de lipides pour la production de biodiesel. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (Bazzarelli et al., 2016).

Il existe dans le monde un intérêt croissant pour la recherche de nouveaux antioxydants sûrs et puissants à partir de sources naturelles. Par conséquent, un grand nombre d'espèces de

microalgues existantes constitue un réservoir unique de biodiversité. Ceux-ci sont bien connus comme une excellente source de composés biologiquement actifs. Outre les protéines de haute qualité contenant des acides aminés essentiels, des fibres alimentaires, des acides gras essentiels, des minéraux, des vitamines et des pigments, notamment les chlorophylles et les caroténoïdes, les algues pourraient également constituer une bonne source de composés phénoliques (Maadane et al., 2015). En conséquence, l'utilisation d'algues ou de molécules extraites de celles-ci, en tant qu'antioxydants, constitue une excellente perspective pour fournir des alternatives plus sûres dans différentes applications dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et autres industries relatives (Gupta et Abu-Ghannam, 2011; Olaizola, 2003; Spolaore, et al. 2006).

L'extraction complète des composants actifs dépend fortement de la température et du temps d'extraction, de la nature des solvants utilisés et de la composition chimique de l'échantillon. Il est bien connu que les microalgues sont riches en composés antioxydants qui pourraient avoir différentes polarités. Par conséquent, l'activité antioxydante des microalgues est invariablement affectée par la polarité du solvant d'extraction (Ahmed et al., 2014; López, et al., 2011; Goh, et al., 2010).

Étant donné le large éventail d'activités associées aux microalgues des eaux douces particulièrement antioxydantes et face à l'apparition de formes résistantes de plusieurs microorganismes, la recherche de nouvelles molécules bioactives est devenue une nécessité. Ainsi, l'exploration du milieu des eaux Algérienne dans ce sens pourrait être d'un grand intérêt. Au niveau de la Wilaya de Tiaret, les barrages existants sont au nombre de trois: Bakhadda (45 millions de m³), Dahmouni (43 millions de m³). Bougara (13 millions de m³).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche dont l'objectif est d'évaluer l'effet antioxydatif des produits bioactifs obtenus des microalgues des eaux douces récoltés du barrage Bakhadda de la Wilaya de tiaret.

Pour pouvoir atteindre cet objectif, la présente étude s'articule autour de trois volets :

1. *Récolte des microalgues et préparation de la matière sèche.*
 - ↗ *Centrifugation, filtration et lyophilisation*
2. *Extraction des biomolécules de la matière sèche préparée.*
 - ↗ *Par macération en utilisant différents solvants organiques.*
3. *Evaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits issu de microalgues.*
 - ↗ *En utilisant le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH)*

***Partie
expérimentale***

Chapitre 1

Matériels et Méthodes

I. Matériel et Méthodes :

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet antioxydatif des produits bioactifs obtenus des microalgues. Pour réaliser cet objectif, notre protocole expérimental s'articule sur trois volets :

1. Récolte des microalgues et préparation de la matière sèche;
2. Extraction des biomolécules de la matière sèche préparée;
3. Evaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits issu de microalgues.

I. 1. Matériels et produits :

L'essentiel des matériels ainsi que les produits utilisés sont présentés dans le Tableau 01.

Tableau 01: Matériel et produits utilisés dans les différents dosages et analyses.

Matériels	Appareillage	Microscope optique, spectrophotomètre UV-Visible, Lyophilisateur.
	Autres	Filet à 20 μ m, Flacons en verre stérile, glacière, pipettes
Produits	Réactifs	DPPH, méthanol, acétone, chloroforme, acide ascorbique
	Autres	Formol, eaux physiologique, lugol

I. 2. Zone de travail :

Les expérimentations de cette étude ont été tenues sur des phytoplanctons naturels (poussant à l'air libre ou à l'état sauvage) collectés du barrage de Bakhadda du bassin hydrographique d'une capacité totale de (45 millions de m³), situé au nord de l'Algérie à 25 km à l'ouest de la ville de Tiaret (Figure 1). Le barrage a pour but de stocker les eaux de l'oued Mina, affluent de l'oued Chellif. Il est essentiellement destiné à l'irrigation de la plaine de Relizane et l'alimentation en eau potable de Rouina et Draa Sfa.

Le Barrage mixte de Bakhadda faisait partie du programme dit « Le programme de 1920 » avec les barrages des Beni-Bahdel, de Bou-Hanifia, de l'Oued-Fodda, du Ghrib, du Ksob, des Zardézas et de Foum-el-Gueiss qui formaient un ensemble remarquable, qui a augmenté considérablement le potentiel économique de l'Algérie grâce à la législation spéciale sur l'exploitation en vue de l'irrigation (Décret-loi du 30 octobre 1935). Le barrage de Bakhadda, sur la Mina affluent du Cheliff, est un barrage en enrochement de 45 mètres de haut. Le masque étanche d'une technique un peu plus ancienne, est en béton armé souple.



Figure 1 : Photographie de l'emplacement de la Wilaya de TIARET et du barrage de Bakhadda (Google Maps)



Figure 2 : Photo du barrage de Bakhadda - TIARET (Photo originale)

I. 3. Échantillonnage :

En général, la saison de croissance des microalgues dans le barrage se caractérise par l'existence d'un excès de nutriments dans l'eau. En ce qui concerne les deux nutriments, le phosphore et l'azote, l'excès constitue à chaque instant l'élément déterminant de la production de la biomasse. Ces microalgues consomment du dioxyde de carbone et des micronutriments; ils sont cultivés naturellement à proximité des rejets liquides des villes en amont du barrage. Ce serait un moyen de traitement des effluents tout en produisant des microalgues qui émettent de l'oxygène afin qu'il n'y ait pas d'odeur à ce barrage, donc elles ont un impact environnemental (Bouزيد et Djelita, 2012).

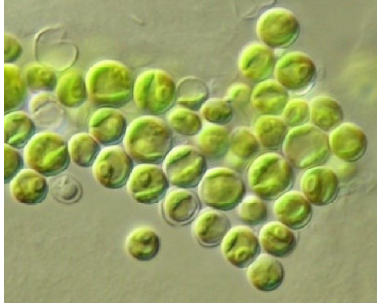
La séparation des algues du milieu de culture naturel des eaux du barrage pour notre étude est une étape critique. En effet, la solution d'algues présente dans le bassin de culture est très diluée (0,1 - 0,3% de matière sèche) et particulièrement stable. Cette stabilité est due à la petite taille des microalgues et leur faible différence de densité avec le milieu de culture, ce qui les fait rester en suspension. Aussi, la membrane chargée négativement dans la plupart des microalgues, les empêchant de s'agréger. L'intensité de cette charge est fonction du type d'algue, du milieu de culture et de son pH. Ce caractère dilué et cette stabilité rendent la récolte des microalgues difficile (Singh, et Patidar, 2018).

I.3.1 Prélèvement :

Le prélèvement des échantillons des microalgues se fait manuellement par la collecte du filet du phytoplancton durant de la période floraison (Figure 4). On prélève litre par litre à la profondeur qui ne doit pas dépasser 30 cm de la surface de l'eau. L'échantillon collecté est versé dans un flacon en verre. Les microalgues prélevées ont été rincées sur place avec de l'eau du barrage puis avec l'eau distillée au niveau du laboratoire. Selon Bouزيد et Djelita, (2012), l'ensemble des phytoplanctons collecté, représente un mélange de différentes espèces comprenant : Chlorophycée, Cyanophycées, Diatomophycées et Euglenophycée (Figure 3).

I.3.2 Conservation et transport :

Les échantillons doivent être transportés dans une glacière. Leur conservation doit se faire à 4°C et à l'obscurité au laboratoire jusqu'à l'analyse. Une fois les algues concentrées et séparées du milieu de culture, une pâte d'algues est obtenue. La durée de vie de celui-ci est limitée et il faut donc la traiter rapidement. Le séchage peut être à la fois un moyen de le conserver plus longtemps et une condition préalable à l'utilisation de certaines techniques d'extraction (Al hattab et Ghaly, 2015).



Photographie d'une Chlorophycée
(http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm)



Photographie d'une Cyanobactérie Anabaena
(<http://www.dr-ralf-wagner.de>)



Photographie de Diatomée
(<http://ccala.butbn.cas.cz/en>)



Photographie d'une Euglenophycée
(<http://protist.i.hosei.ac.jp>)

Figure 3 : Photographies de quelques microalgues eucaryotes



Figure 4 : Photographie des microalgues (Bloom) poussant au barrage de Bakhadda. (*Photo originale*)

I.3.3 Identification des microalgues :

L'identification des différentes espèces de microalgues récoltées a été réalisée par l'observation microscopique optique de la forme des cellules (Figure 5). La suspension contenant les microalgues doit être placée sur la lame pour l'observer sous microscope optique. On ajoute de l'eau physiologique dans le flacon si les échantillons sont condensés. Brasser la suspension et prélever quelque goutte d'échantillon. Puis, sur une lame, quelques gouttes d'échantillon ont été déposées. Une goutte du lugol doit être déposée entre la lame et la lamelle. L'observation au microscope se fait au (x10 et x 40).

I.3.4 Préparation des échantillons :

Après le prélèvement, les microalgues récoltées ont été rincées sur place avec de l'eau du barrage puis avec l'eau distillée au niveau du laboratoire. La biomasse peut être utilisée humide ou séchée. Elle peut être séchée par séchage solaire avec une longue durée de séchage, par pulvérisation, surtout pour les molécules à haute valeur ajoutée, et qui est coûteux et détruit les pigments présents dans les algues, ou par lyophilisation qui est onéreux et énergivore mais permet l'extraction des huiles (Brennan et Owende, 2010). Dans la littérature, la récolte peut se faire par centrifugation, filtration, floculation, sédimentation ou flottation.

↗ La centrifugation :

Cette technique de concentration utilise la force centripète afin de permettre la séparation des micro-algues avec le milieu de culture par simple différence de densité. Selon Park et al. (2011), la centrifugation est efficace à 90% et le taux de récupération est directement lié au débit fixé en amont. Cette méthode est rapide et efficace, et représente une des méthodes les plus utilisées à l'échelle industrielle. Cependant, cette méthode est coûteuse en énergie ce qui la rend difficilement réalisable économiquement (Rawat et al., 2011).

↗ La sédimentation :

La sédimentation est une technique qui repose sur le principe de gravité. Les cellules en suspension dans le milieu vont être soumises à la gravité et vont former dans la partie inférieure un dépôt de particules solides et dans la partie supérieure une phase liquide. Les micro-algues de grande taille et de forte densité vont pouvoir être récoltées par sédimentation comme par exemple la spiruline. La vitesse de sédimentation peut être nettement améliorée grâce à l'ajout de flocculants (Chen et al., 2011).

↗ La filtration :

Dans cette méthode, la suspension micro-algale passe au travers d'un filtre, en ne retenant que les cellules. Il existe différentes formes de filtration ; la microfiltration, la filtration sous vide, sous pression, l'ultrafiltration et la filtration à flux tangentiel. Le choix du type de filtration sera dépendant de la taille de l'espèce à récolter. En dépit d'être des méthodes de récoltes attractives, d'un point de vue énergétique, la microfiltration et la filtration sous vide sont coûteuses en énergie (Dejoye Tanzi, 2013).

↗ La floculation :

La floculation est un procédé dans lequel les particules en solution se rejoignent afin de former des agrégats appelés (flocs). Lorsque la floculation est combinée à la sédimentation ou à la filtration son efficacité est nettement augmentée (Rawat et al., 2011).

↗ La flottation :

La flottation est un procédé basé sur la gravité, dans lequel des bulles de gaz sont liées aux particules solides (cellules micro-algales) leur permettant ainsi de (flotter) à la surface. Des études ont montrées que le système de flottation pour la récolte des micro-algues était une méthode efficace pour les cellules de petites tailles comme *Nannochloropsis oculata* (Rawat et al., 2011).

Dans notre étude, pour la préparation de la matière sèche des microalgues nous avons réalisé trois étapes principales :

1. **Filtration du milieu de culture:** Cette méthode consiste à faire circuler le milieu de culture perpendiculairement à la surface d'un filtre (moins de 40 μm), sur lequel les cellules de microalgue se concentrent constamment.
2. **Centrifugation :** l'application d'une force comprise entre 500 et 1000g permet d'isoler rapidement de 80 à 90% des microalgues contenues dans le milieu de culture.
3. **Lyophilisation :** L'échantillon congelé de microalgues brutes (environ 200 g) a été introduit directement dans le lyophilisateur au niveau du laboratoire de Chimie, Université de Tlemcen (Figure 5). La température a été réduite à $-51,4^{\circ}\text{C}$ et la pression a encore été réglée à 0,011 mbar. Le processus de la lyophilisation a été réalisé sous vide pendant 48h. La matière sèche a été stockée à -20°C jusqu'à utilisation pour les extractions.



Figure 5: Lyophilisation des microalgues (Photo originale)



Figure 6: Matière sèche après lyophilisation (Photo originale)

I. 4. Extraction des composés bioactifs :

Les composés bioactifs y compris les lipides des micro-algues sont stockés au sein des cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi. Ainsi, leur extraction nécessite donc une étape visant à fragiliser les parois cellulaires afin de les rendre accessibles aux solvants. Pour ce faire, plusieurs traitements sont possibles : le broyage, les ultrasons (Kim et al., 2013), les micro-ondes (Koberg et al., 2011), les chocs osmotiques, la lyse enzymatique, etc... (Cho et al., 2013).

L'acétone et le méthanol sont les principaux solvants utilisés pour l'extraction des pigments. Le méthanol a quelques avantages pour l'extraction, tels que la volatilité inférieure par rapport à l'acétone, et produit également des pics avec une résolution plus élevée par rapport aux pigments extraits dans l'acétone (Dejoye Tanzi, 2013). Le solvant d'extraction idéal des lipides marins doit non seulement satisfaire les critères mentionnés précédemment mais aussi posséder un point d'ébullition faible afin de faciliter son élimination.

Pour notre étude, deux méthodes différentes ont été réalisées (décoction et macération) pour extraire les composés actifs présents dans les microalgues (Figure 6), en utilisant quatre solvants de polarités différentes: eau, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme. Pour l'extraction par macération, un gramme (1) g de la biomasse lyophilisée a été macéré dans 60 mL (25°C), à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 24h.

Pour la méthode de décoction, une quantité d'un gramme (1) g de la matière sèche a été mélangée avec 60 ml de chaque solvant et soumise sous reflux dans l'obscurité pendant 3 heures. Tous les extraits ont été ensuite filtrés en utilisant du papier filtre Whatman (grade 1) et évaporés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif afin d'obtenir un résidu sec. Les extraits aqueux ont été centrifugés et le surnageant récupéré a été filtré et lyophilisé. Les extraits aqueux ont été stockés à – 20°C pour être récupéré ensuite dans le méthanol pour une analyse ultérieure (Djamai, 2019).

I. 4. 1. Calcul des rendements en extraits

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait après évaporation du solvant et la masse de la matière sèche ayant servi pour l'extraction. Il est exprimé en pourcentage (%), et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{m1}{m2} \times 100$$

Où :

m1 : la masse de l'extrait évaporé

m2 : la masse de la matière sèche

I. 4. 2. Calcul de l'Indice de polarité

Les valeurs de l'indice de polarité (**Pi**) des mélanges de solvants utilisés ont été calculées en utilisant la deuxième équation appropriée à un mélange de deux solvants (Hemwimon, et Shotipruk, 2007) :

$$P_i = \varnothing_a P_a + \varnothing_b P_b$$

Où :

\varnothing_a : Fraction volumique du solvant 1.

\varnothing_b : Fraction volumique du solvant 2

P_a : Indices de polarité du solvant 1

P_b : Indices de polarité du solvant 2

I. 5. Évaluation des activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir de la matière sèche des microalgues peut se faire par plusieurs méthodes. On cite la méthode par le piégeage du radical libre DPPH, la méthode de blanchiment du β -carotène (BCB), la méthode de réduction de fer (FRAP),..etc.

Dans la présente étude, la capacité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH).

I. 5. 1. Piégeage du radical libre DPPH

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité du radical DPPH à être réduit à la forme d'hydrazine qui est non radical tout en acceptant un atome d'hydrogène, selon la méthode de Sanchez-Moreno et al.(Larrauri et Saura, 1998). L'avantage de cette méthode est qu'elle est indépendante de la polarité de l'échantillon en plus qu'elle est rapide, simple et pratique.

Un volume de 50 μ L de chaque extrait à différentes concentrations est ajouté à 1,950 L de la solution méthanolique de DPPH fraîchement préparée (0,025 mg/ mL). Le mélange a été vortexé et maintenu pendant 30 minutes à l'obscurité. La diminution de l'absorbance de la solution, due à l'activité donneuse de proton par composant (s), a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 517 nm. Les mesures ont été effectuées en triplet pour chaque concentration. L'activité antioxydante de l'extrait a été exprimée en IC50 (concentration d'inhibition à 50 %). Cette valeur a été définie comme la concentration en mg de matière sèche par mL (mg/ mL). L'acide ascorbique (Vitamine C) est utilisé comme référence (un antioxydant très puissant), et son IC50 a été utilisée pour comparer l'activité de balayage radicalaire des différents extraits testés (Djamai, 2019).

Le pourcentage de réduction du DPPH (DPPH %) est calculé par la formule suivante :

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(\text{DO contrôle}) - (\text{DO échantillon})}{(\text{DO contrôle})} \times 100$$

Où :

DPPH (%) : Pourcentage de réduction du DPPH.

DO contrôle : Densité optique du tube contrôle négatif.

DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.

La valeur IC₅₀ est la concentration d'extrait qui assure la réduction de 50 % du DPPH, déterminée graphiquement par la régression linéaire, pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration. La stabilité et la linéarité de la solution de DPPH doivent être évaluées avant de commencer le test antioxydant et le résultat est présenté graphiquement. Cinq solutions de DPPH (20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) ont été préparées, puis l'absorbance des échantillons a été mesurée à 30, 60 et 120 min à 517 nm dans l'obscurité, avec du méthanol à blanc avec le spectrophotomètre UV-Visible (Djamai, 2019).



Figure 7: Extraction des composés bioactifs (Photo originale)

I.6. Analyses statistiques :

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel statistique informatisé STATISTICA. Tous les analyses et dosages des échantillons ont été réalisés en triplet dans un ordre aléatoire et des moyennes ont été considérées (sous forme de moyenne \pm écart type).

Chapitre 2

Résultats et Discussion

II. Résultats et Discussions :

Cette partie, consiste à présenter et interpréter les résultats obtenus de la partie expérimentale afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits obtenus de la matière sèche des microalgues d'eaux douces récoltés du barrage.

II.1. Identification de microalgues récoltées:

Les microalgues peuvent mesurer de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres, selon les espèces (Kherraf, 2018). Elles présentent une très grande diversité de molécules au sein de leurs cellules (Figure 8).

Les microalgues sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques. Il existe donc différentes classes taxinomiques de microalgues (Tableau 2) dont les principales sont les cyanophycées, les chrysophycées, les rhodophycées, les euglénophycées, les chlorophycées et les bacillariophycées.

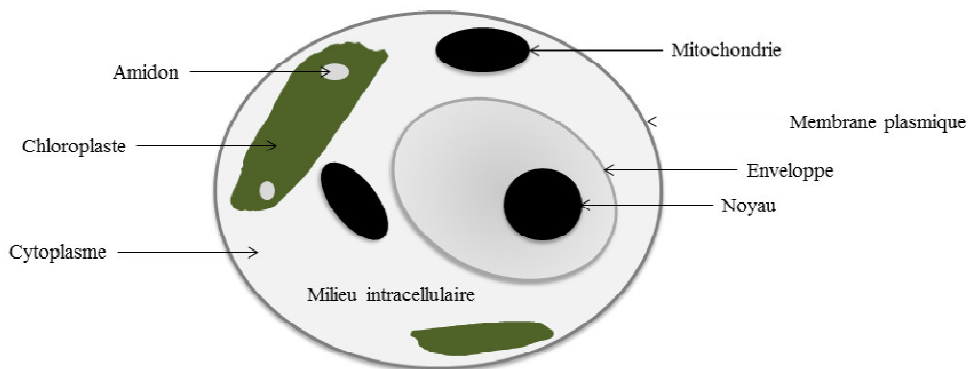


Figure 8 : Schéma d'une structure de micro-algue unicellulaire

Tableau 2 : Résumé des groupements majeurs des algues selon Mitchell, 1974

Phylum	Nom Commun et Espèces	Pigments	Caractéristiques
Cyanophyte	Algues bleues- vertes Spirulina, Anabaena	bleu-vert: phycocyanine, phycoérythrine, chlorophylle a et b	Multicellulaire ou unicellulaire mais Habituellement microscopique.
Euglenophyte	Euglenoïde Euglena	Vert	unicellulaire, mobile, sans membrane cellulaire.
Chlorophyte	Algues vertes Chlorella, Scenedesmus	Vert: chlorophylle a et b.	Unicellulaire, multicellulaire, quelques unes microscopiques, membrane cellulaire formée de cellulose et de pectine.
Chrysophyte	Algues jaune-vertes ou brunes claires Diatomées	Jaune - vert, brun clair: xanthophylle, carotènes et chlorophylle.	Microscopique, unicellulaire, leur membrane cellulaire contient de la silice.
Pyrophyte	Dinoflagellés, Peredinium, Massartia	jaune-vert, brun foncé: Xanthophylle, chlorophylle a et c.	Unicellulaire, mobile, membrane cellulaire en cellulose.
Phaeophyte	Algues brunes Fucus	Vert d'Olive, brun foncé: fucoxanthine, xanthophylle, chlorophylle a et c.	Multicellulaires principalement, vivent dans les eaux marines, leur membrane cellulaire est formée en pectine et en cellulose.
Rhodophyte	Algues rouges Polysiphonia	Rouge: phycocyanine, phycoérythrine et chlorophylle a.	La plupart sont multicellulaires, vivent dans les eaux marines et possèdent une membrane en cellulose et en pectine.

II.1.1. Observation microscopique :

Dans cette partie d'étude, on n'a pas réussi à identifier, par observation microscopique de la morphologie, toutes les espèces présentes dans le milieu de culture. Par ailleurs, la comparaison des morphologies a montré que l'espèce prépondérante parmi les souches d'eau douce isolées est *Chlorella* (Figure 9).

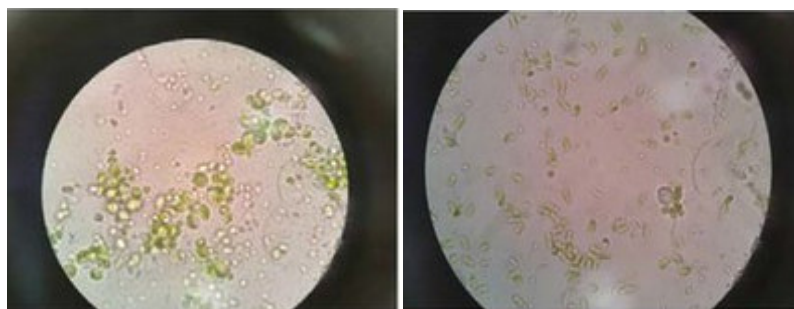


Figure 9 : Observation microscopique des souches de microalgues (*Photo originale*)

II. 2. Extraction des composés bioactifs :

La position des composés bioactifs y compris les pigments dans les microalgues, renfermés dans la paroi cellulaire, nécessite une procédure susceptible à décomposer cette paroi afin d'extraire les composés bioactifs avec un risque minimal de les endommager. Pour cela une extraction par solvant, qui a la capacité de pénétrer la paroi cellulaire, avec une polarité correspondante à la molécule cible est exigé.

II. 2. 1. Calcul des rendements en extraits :

Les rendements d'extraction trouvés relatifs aux différents extraits de microalgues exprimés en % poids (g) /poids (g) de matière sèche sont présentés dans le tableau (3).

D'après les résultats d'extraction de la matière sèche obtenus, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait aqueux des deux méthodes d'extraction macération et décoction (19,16 et 23,19 % g/g MS, respectivement), alors que les plus faibles valeurs ont été enregistrées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 1,28 et 2,03 % g/g MS par macération et décoction, respectivement. Il est à noter aussi qu'une légère augmentation de rendement d'extraction de décoction par rapport à celle de macération a été remarquée. Nos résultats étaient en concordance avec ceux trouvés par Djamai, 2019 (Tableau 3).

Tableau 3: Rendement des extraits de microalgues

Solvant Utilisé	Rendement d'extraction (g/g) MS		Résultats (Djamai, 2019)	
	Macération	Décoction	Macération	Décoction
Méthanol	12.01	8.17	10.42	9.26
Méthanol 80%	10.23	11.71	9.39	10.61
Acétone 90%	6.17	9.81	7.59	8.8
Chloroforme	1,28	2,03	2.01	2.84
Eau	19,16	23,19	20.74	29.74

II. 2. 2. Calcul de l'Indice de polarité :

Les valeurs de l'indice de polarité calculées selon le solvant utilisé sont présentées dans le tableau (4). Il est constaté que le rendement des extraits augmente avec l'augmentation de la polarité des solvants utilisés. La même constatation a été reportée par Djamai, (2019). Cette relation pourrait s'expliquer par la présence de certains composés polaires comme les composants hydrosolubles tels que les glucides solubles, protéines et peptides. Wang et al., (2009) avait suggéré que c'est aussi la raison pour laquelle l'extrait aqueux obtenu était très visqueux à cause de la forte teneur en alginate dans la matière sèche des microalgues .

Tableau 4: Valeurs d'Indice de polarité des solvants utilisés pour l'extraction

Solvant Utilisé	Indice de polarité (Pi)	Résultats (Djamai, 2019)
Méthanol	4.7	5.1
Méthanol 80%	6.3	6.08
Acétone 90%	4.9	5.59
Chloroforme	4.2	4.1
Eau	9.7	10

II. 3. Évaluation des activités antioxydantes :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthyl benzothiazoline -6- sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH (Popovici, 2009 ; Ozen, 2009).

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Park et al., 2001).

Dans notre étude, l'évaluation de l'effet antioxydatif des différents extraits obtenus par macération et décoction a été procédée à travers le test DPPH. Malheureusement, nous n'avons pas pu finir le protocole expérimental et par conséquent avoir des résultats. De ce fait, nous allons présenter et interpréter les résultats trouvés par Djamai, (2019) et ceux de Kherraf, et al. (2017).

II. 3. 1. Piégeage du radical libre DPPH

Pour le travail réalisé par Djamai, (2019), l'activité antioxydante des extraits a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH. La stabilité et la linéarité de la solution de DPPH ont été évaluées avant le début du test, dont aucune différence significative n'a été observée dans l'absorbance durant les 2h pour les concentrations testées dans l'obscurité, avec une très bonne linéarité obtenue de l'absorbance par rapport aux différentes concentrations du radical DPPH.

Alors que d'après les résultats de Kherraf, et al. (2017), on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits de la microalgue sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. Sur la base de ce principe, le pourcentage d'inhibition de DPPH dans ce cas est de $22,37 \pm 3,5\%$ et

12.27±1,4% pour EENg et EMNg respectivement avec des concentrations des extraits de 0.5 mg / ml. Ces résultats sont proche à ceux de (Hemalatha et al., 2013) qui ont trouvé que le pourcentage d'inhibition chez les extraits méthanolique de *Chlorella marina* (23,08%) et *Dunaliella salina* (17,66%) et de *Navicula clavata* (15%) et ceux de (safafar et al, 2015) qui ont rapporté que le pourcentage d'inhibition chez *Nannochloropsis limnetica* et *Nannochloropsis salina* est de 19.44% et 21.26% respectivement avec une concentration de 0.5mg/ml.

II. 3. 2. Evaluation de l'IC 50 :

La capacité antioxydante d'un composé est inversement liée à IC50, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevé (Pokorny et al, 2001). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

D'après les résultats trouvés par Kherraf, et al. (2017), nous remarquons que les valeurs des IC50 des extraits s'échelonnent entre 1.16 ± 0.06 mg/ml pour EENg et 2.02 ± 0.04 pour EMNg comparées à celles de l'acide ascorbique (0,11mg/ml). Ceci est significatif et montre que la microalgue a une capacité modéré à réduire les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres. Maadane et al., (2015) ont indiqué que IC50 de l'extrait éthanolique de *Nannochloropsis gaditana* est de 365 µg/ml comparé à celui de la vitamine C (2.5µg/ml).

Selon les résultats obtenus par Djamaï, (2019), le pouvoir antiradicalaire le plus élevé a été obtenu par la méthode de macération dans l'extrait méthanolique (IC₅₀ = 2,04 ± 0,6 mg ES mL⁻¹). Alors que l'extrait aqueux obtenu par la même méthode d'extraction (macération) présente la plus faible activité (IC₅₀ = 11,29 ± 0,6 mg ES mL⁻¹).

II. 3. 3. Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire

Les résultats obtenus par Djamaï, (2019), montrent une corrélation importante pour la majorité des extraits qui égale à 0,868 entre l'activité antiradicalaire et les polyphénols utilisant la méthode de macération. Tandis qu'une corrélation moyenne de 0,504 et 0,469 ont été observées entre l'activité et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes accordé par

décoction respectivement, en ce qui concerne les pigments, une faible corrélation a été constatée.

Contrairement à quelques travaux antérieurs qui ont trouvé des corrélation non significatives entre l'activité antioxydante et les composés phénolique et/ou les caroténoïdes (Shetty et Sibi, 2015); ces résultats concordent avec ceux d'études précédentes (Bulut et al., 2019) suggérant que les composés phénoliques, qui dépendent fortement de la polarité du solvant utilisé, sont les principaux constituants en tant que piègeur des radicaux dans les microalgues, y compris la possibilité de contenir des dérivés de vitamines, d'acides organiques et de complexes métalliques qui peuvent aussi être détecté par le réactif du Folin (Everette et al., 2010).

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de notre travail était la valorisation des microalgues qui se forment naturellement dans les eaux de surface de barrage de Bakhadda, situé à la Wilaya de Tiaret, par l'extraction en utilisant deux méthodes et l'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits. Il est bien connu que les microalgues ont un potentiel important dans une grande variété d'applications puisqu'elles pourraient contenir différents composés bioactifs selon l'espèce microalgale.

D'après les résultats d'extraction de la matière sèche obtenus, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait aqueux des deux méthodes d'extraction macération et décoction (19,16 et 23,19 % g/g MS, respectivement), alors que les plus faibles valeurs ont été enregistrées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 1,28 et 2,03 % g/g MS par macération et décoction, respectivement. Les microalgues récoltées avec une variété dans leur contenu en molécules bioactives importantes, qui ont des propriétés antioxydantes confirmées par leurs pouvoirs antiradicalaires, permettant leurs utilisations dans les domaines de la santé et de l'alimentation.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail confirment l'intérêt d'étudier les différentes possibilités de la valorisation des microalgues des eaux douces. D'une part, pour réduire leur quantité énorme et par conséquent leur impact négatif sur l'environnement aquatique. Et d'autre part, pour les utiliser comme sources des produits d'intérêt économique.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des microalgues d'eaux douces afin d'étudier les éventuelles possibilités d'obtention des composés bioactifs tel que les antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancer, etc, car il pourrait y avoir un potentiel d'utilisation de tels extraits ou dans le traitement de diverses maladies liées au stress oxydatif, ou encore dans un large éventail de produits alimentaires.

***Références
Bibliographiques***

Références Bibliographiques

- 📖 Abadli M, Harkati G, (2015). Contribution à l'inventaire des quelques microalgues vertes d'intérêt nutritionnel dans quelques zones humides de la wilaya d'El Oued . Memoire de master académique, Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued.
- 📖 Al hattab, M., & Ghaly, A. (2015). Microalgae Oil Extraction Pre-treatment Methods: Critical Review and Comparative Analysis Fundamentals of Renewable Energy and Applications, 5(4)
<https://doi.org/10.4172/20904541.1000172>
- 📖 Bazzarelli, F., Piacentini, E., Poerio, T., Mazzei, R., Cassano, A., & Giorno, L. (2016). Advances in membrane operations for water purification and phenols recovery/valorization from OMWWs. *Journal of Membrane Science*, 497, 402–409.
<https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2015.09.049>
- 📖 Bouzid-Lagha, S., et Djelita, B. (2012). Etude du phénomène d'eutrophisation dans le Barrage de Hammam Boughrara (Wilaya de Tlemcen, Algérie). *Hydrological Sciences Journal*, 57(1), 186–201.
<https://doi.org/10.1080/02626667.2011.634417>
- 📖 Brennan, L. et Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (567)
- 📖 Bulut, O., Akın, D., Sönmez, Ç., Öktem, A., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2019). Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1726-5>
- 📖 Cacamesse S., Azzolina R., Rurnari G., Gormaci M., Grasso S., (1980). Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean algae, *Bot. Mar*, (23). 285-288.
- 📖 Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., **2011**. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102, 71–81.

- 📖 Cho, H.-S., Oh, Y.-K., Park, S.-C., Lee, J.-W., Park, J.-Y., 2013. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 54, 156–160.
- 📖 Dejoye Tanzi, C. (2013). *Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant*. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France
- 📖 Deslandes E., Pondaven E., Auperin T., Roussakis C., Guézennec J., Stiger V., Payri C., (2000). Preliminary study of the in vitro anti-proliferative effect of a hydroethanolic extract from the subtropical seaweed *Turbinaria ornata* (Turner J. Agardh) on a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6) : *Journal of Applied Phycology*. 257–262.
- 📖 Djamai, W. (2019). *Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactives*. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Faculté des sciences, Algérie.
- 📖 Erell Olivo., (2007). Thèse de Doctorat « Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en éclosiers aquacoles », Université de Nantes, France
- 📖 Etahiri S., Bultel- Ponce V., Assobhei O., (2004). Une nouvelle molécule à activité antibiotique à partir de l'algue rouge *Pterosiphonia complanata*, Brevet Marocain N° 27732.
- 📖 Etahiri S., Bultel-Poncé V., Caux C, Guyot M., (2001). New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*, *Journal of Natural Products*, 64(1-2). 1024-1027.
- 📖 Etahiri S., El kouri A., Bultel-Ponce V., Guyot M., Assobhei O., (2007). Antibacterial bromophenol from the marine red alga *Pterosiphonia complanata*, *Natural Product Communication*, (2). 749-752.
- 📖 Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>

- 📖 Fleury B.G., Kelecom A., Periera R.C., Teixeira V.L., (1994). Polyphenol, terpene and sterols in Brazilian Dictyotales and Fucales (Pheophyta), *Bot Mar.* 457- 462.
- 📖 HABCHI S. et Hidja N. (2013). Conception d'un photobioréacteur pour la culture de microalgues , MASTER EN GENIE CHIMIQUE, Université Abderrahmane Mira – Béjaïa
- 📖 Hemalatha A, Girija K, Parthiban C, Saranya C and Anantharama P.(2013). Antioxidant properties and total phenolic content of a marine diatom, *Navicula clavata* and green microalgae, *Chlorella marina* and *Dunaliella salina*. *Advances in Applied Science Research*, 4(5): 151-157
- 📖 Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44–50.
- 📖 Hernandez, L. (2006) (Supervision et diagnostic des procédés de production d'eau potable). Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.France.
- 📖 Julie PERSON [Trimatec] (2010). (LIVRE TURQUOISE ; Algues, filières du futur)
- 📖 Kherraf, A., Tehami, W., Boufeldja, W., Yahla, I., Dra, G. A., Mansour, I. F. Z., & Benali, M. (2017). Determination of the nutritional and functional metabolites of *Nanochloropsis gaditana* produced in Algeria and evaluation of its antioxidant activity. *South Asian Journal of Experimental Biology*, (7), 17–20.
- 📖 Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M.H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-G., Lee, S.H., 2013. Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy* 56, 99–103.
- 📖 Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A., 2011. Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nanochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology* 102, 4265–4269.
- 📖 Ktari L., (2000). Recherche de composés actifs dans les algues marines: propriétés

pharmacologique, stimulation du cycle biologique de l'algue et de la biosynthèse d'un métabolite. Thèse. Univ. Paris (VI).140.

- 📖 Ktari L., Guyot M., (1999). A cytotoxicosterol from the marine algae *Padinapavonica*, *Journal of Applied Phycology*, (11).511-513.
- 📖 Larrauri, A., & Saura-calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 270, 270–276.
- 📖 Maadane A, Merghoub N, Ainane T, El Arroussi H, Benhima R, Amzazi S, Bakri Y, Wahby I.(2015).Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology* 215:13
- 📖 Ozen T., Demirtas I ., Aksit H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*, (124), 58-64p.
- 📖 Park B.S, Lee H.K, Lee S.E, Piao X.L, Takeoka G. R., Wong R. Y., Ahn Y.J.,Kim J.H., (2006). Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Tahebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology*, (105) : 255-262p.
- 📖 Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 35–42.
- 📖 Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited.
- 📖 Popovici C. , Ilonka S ., Bartek T.,(2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH *Revue de génie industriel*,(4), 25-39p.
- 📖 Ravi b. N., Murphy P. T., Lidgard R. O., Warren R. G., Wells R. J. C., (1982). 18 terpenoid metabolites of the brown alga *Cystophoramoniiformis*, *Aust. J. Chem*, (35). 171- 182
- 📖 Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., **2011**. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable

biofuels production. *Applied Energy* 88, 3411–3424.

- 📖 Reichelt J. L., Borowitzka M.A., (1984). Antimicrobial activity from marine algae: Result of a large screening programme, *Hydrobiol*, (1). 116/117.
- 📖 Safar, H, van Wageningen, J, Møller, P, & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine drugs* 13(12): 7339–7356.
- 📖 Shetty, V., & Sibi, G. (2015). Relationship Between Total Phenolics Content and Antioxidant Activities of Microalgae Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth. *Journal of Food Resource Science*, 4(1), 1–9
- 📖 Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508.
- 📖 Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248.
- 📖 Wright A. D., M. Konig G., Angerhofer C. K., Greenidge P., Linden A., Desquerouxfandez R., (1997). Anti-malarial activity: the search for marine-derived natural products with selective anti-malarial activity, *Journal of Natural Products*, (59). 710-716.
- 📖 Zubia D., Robledo D., Freile-Pelegri Y., (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan peninsula Mexico, *Journal of Applied Phycology*, (19). 449- 45

Annexes

Annexe 1

Microalgues

1. DEFINITION ET ORIGINE DES MICROALGUES

Le terme microalgue comprend par définition les organismes microscopiques photosynthétiques uni- et oligo-cellulaire, avec une taille qui varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres, à la base de la chaîne alimentaire et producteurs primaires d'oxygène. Leur existence et plus précisément les cyanobactéries, remontent à plus de 3,4 milliards d'année. Ces micro-organismes, dénommées également phytoplancton, produits rapidement à partir de l'énergie solaire, du dioxyde de carbone et des nutriments présents dans divers habitats aquatiques (eau douce, saumâtre et salé), ou même terrestres (le sol ou sur le tronc des arbres). Cette biomasse reconnue ubiquistes, c'est-à-dire qu'ils croissent dans différents écosystèmes démontrant un haut degré de biodiversité, une grande variété de formes et conséquemment une multitude de voies métaboliques. Il a été considéré comme une alternative prometteuse, dite biomasse de la troisième génération .

2. DIVERSITE

Les microalgues représentent une immense biodiversité, ensemble très hétérogène en terme de morphologie et de physiologie, où il est estimé qu'il existe plus de 50 000 espèces parmi lesquelles environ 40 000 ont été étudiées et analysées. Ce sont des cellules simples qui sont classées comme procaryotes (microalgues bleues ou cyanobactéries) ou eucaryotes (microalgues vertes, rouges et brunes). Ce classement se fait à la base de leurs propriétés et caractéristiques morphologiques.

2.1 Les procaryotes

Les microalgues procaryotes sont des organismes unicellulaires dépourvues de noyau (une structure bactérienne classique), où les chromosomes se trouvent dans le cytoplasme, entourés par des membranes lamellaires qui contiennent les pigments photosynthétiques.

- Les cyanobactéries se caractérisent par leurs structures cellulaires procaryotes, dont la présence de la chlorophylle a et des pigments hydrosolubles (les phycobilines rouge et bleu) les distinguent des bactéries. Ce groupe représente éventuellement le groupe photosynthétique le plus important sur terre par la présence de plus de 6 000 espèces, dont la *Spirulina* et la *Nostoc* sont parmi les espèces les plus connues, d'une coloration bleu-verte et d'une taille d'environ 10 µm. La reproduction des cyanobactéries est connue végétative (asexuée) et leurs croissance peut être d'une manière naturelle sur les surfaces d'eau et également dans le sol

avec la présence de la lumière (la seule exigence) qui est considérée comme un paramètre indispensable pour son développement. A l'absence de cette dernière, ces microorganismes font en sorte d'emmagasiner principalement leur énergie sous forme de lipide ou d'amidon. De ce fait, en plus de leur importance comme producteurs primaires d'oxygène, les cyanobactéries sont une source de métabolite primaire.

2.2 Les eucaryotes

Les microalgues eucaryotes sont des organismes uni ou pluricellulaires qui possèdent une structure végétale classique compartimenté contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires y compris les chloroplastes qui renferment les pigments photosynthétiques.

- Les Chlorophycées sont des microalgues vertes, la plus grande classe variée de la division des chlorophyta, faciles à être cultivé dans les eaux douces ou marines. Elles sont unicellulaires ou pluricellulaires avec généralement une petite taille (<20µm), dont la paroi cellulaire peut être épaisse (ex : *Chlamydomonas*) ou absente et entourée seulement par la membrane plasmique (ex : *Dunaliella*). Chez ces microorganismes, l'amidon est considéré comme la substance de réserve fondamentale ainsi que les lipides. En outre, elles renferment de la chlorophylle a et b, avec les principaux caroténoïdes (β-carotène, lutéine, violaxanthine) en plus des caroténoïdes mineurs (zéaxanthine) identique à celle des plantes supérieures, par conséquent, elles ont été commercialisées à diverses applications tel qu'un additif alimentaire diététique, colorant alimentaire...etc. - Les Diatomées forment une classe des microalgues très répandues dans tous les types d'habitats, caractérisées par leurs structures eucaryotes et unicellulaires qui mesurent généralement de 2 à 200 µm avec certaines atteignant quelques millimètres (1 à 3 mm), ces espèces sont d'ailleurs reconnues par une coquille en silice (frustule) enveloppant la cellule, ainsi que par la présence de chlorophylle a et c et des pigments accessoires comme le β-carotène et la fucoxanthine dans des chloroplastes. En outre, il est bien connu que ces phytoplanctons sont riches en polysaccharide (chrysolaminaran) et les lipides plus particulièrement les triglycérides comme composant majeurs, qui constituent une réserve énergétique très importante .

- Les Euglenophycées sont une classe de flagellés de l'embranchement des Euglenophyta, des algues vertes unicellulaires entourées d'une pellicule de bande protéique autour de la cellule. Leur croissance peut être généralement sur les eaux douces et très rarement dans les eaux marines et saumâtres, comme elles ont tendance à se développer dans de petits bassins enrichis en composés organiques, avec un mode de culture autotrophe ou hétérotrophe

dépendant de l'espèce microalgale. L'aliment de réserves de ces microorganismes est bien des glucides ou de l'amidon, le chrysolaminarine et plus particulièrement le paramylon qui est un polyoside de réserve spécifique des Euglenophyta. Les Euglenophycées semblent être aussi une source riche en pigments et cela par la présence des chlorophylles a et b dans leurs chloroplastes en plus des caroténoïdes et des xanthophylles.

3. COMPOSITION BIOCHIMIQUES DES MICRO-ALGUES & INTERET POTENTIEL

Les microalgues ont été reconnues comme une matière première, dite de troisième génération, non seulement parce qu'elles éliminent le dioxyde de carbone de l'atmosphère, mais aussi parce qu'elle est une source inépuisable d'une variété de bioproduit photosynthétiques, sous diverses forme, tels que des composants cellulaires ou des matériaux de stockage, dont les principales biomolécules (Tableau.1) comprennent les protéines, les polysaccharides ainsi que les lipides. Par conséquent, ils ont un potentiel énorme dans une grande variété d'applications. C'est grâce à la teneur importante en protéines, qu'en 1940, des chercheurs se sont intéressés aux microalgues comme aliments, alors qu'une cyanobactérie avait été une première à être utilisée comme nourriture en Chine et avant 2000 ans comme aliment aussi pour survivre une famine .

**Tableau: Composition générale de différents espèces microalgale
(% de matière sèche) (Trivedi et al., 2015)**

Espèce	Protéine	Glucide	Lipide
<i>Anabaenacylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Aphanizomenonflos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorellapyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Dunaliellabioculata</i>	49	4	8
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Porphyridiumcruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Prymnesiumparvum</i>	28–45	25–33	22–38
<i>Scenedesmusobliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Scenedesmusquadricauda</i>	47	-	1,9
<i>Scenedesmusdimorphus</i>	8–18	21–52	16–40
<i>Spirogyrasp.</i>	6–20	33–64	11–21
<i>Arthrospira maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirulinaplatensis</i>	46–63	8–14	4–9
<i>Synechococcussp.</i>	63	15	11
<i>Tetraselmismaculate</i>	52	15	3